

Application à la Pathologie
DE
L'ÉLECTROPHORÈSE
en tampon " Tris-E.D.T.A.-Borate "

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 octobre 1959

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

André RACADOT

Ancien Externe des Hôpitaux de Nancy

Né le 13 octobre 1932 à Nancy (M.-et-M.)

Examineurs de la Thèse.... { MM. MICHON, Professeur President.
NEIMANN, Professeur }
E. de LAVERGNE, Professeur Agrégé. } Juges.
PAYSANT, Professeur Agrégé }

NANCY
IMPRIMERIE GEORGES THOMAS
Angle des rues de Solignac et Henri-Lepage

1960

1959

Application à la Pathologie
DE
L'ÉLECTROPHORÈSE
en tampon " Tris-E.D.T.A.-Borate "

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 octobre 1959

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

André RACADOT

Ancien Externe des Hôpitaux de Nancy

Né le 13 octobre 1932 à Nancy (M.-et-M.)

Examineurs de la Thèse...	{	MM. MICHON, Professeur	President.
		NEIMANN, Professeur	Juges.
		E. de LAVERGNE, Professeur Agrégé.	
		PAYSANT, Professeur Agrégé	

NANCY
IMPRIMERIE GEORGES THOMAS
Angle des rues de Solignac et Henri-Lepage

1960



Université de Nancy - Faculté de Médecine

Doyen: M. P. SIMONIN

Assesseur: M. H. VERMELIN

Doyens Honoraires

MM. LUCIEN, MERKLEN et Jacques PARISOT

Professeurs Honoraires

MM. BOUIN, ANCEL, JACQUES, JEANDELIZE, FRUHHINSHOLZ, SANTENOISE
CHAILLEY-BERT, HAMANT, BINET, AREL, CAUSSADE, MUTEL

PROFESSEURS:

Anatomie	M. BEAU.
Anatomie pathologique	M. FLORENTIN.
Bactériologie et parasitologie	M. HELLUY.
Chimie biologique	M. WOLFF.
Clinique chirurgicale A	M. CHALNOT.
Clinique chirurgicale B	M. BODART.
Clinique gynécologique	M. BERTRAND.
Clinique médicale A	M. MICHON P.
Clinique médicale B	M. KISSEL.
Clinique médicale infantile	M. NEIMANN.
Clinique obstétricale	M. VERMELIN.
Clinique ophtalmologique	M. THOMAS.
Clinique oto-rhino-laryngologique	M. GRIMAUD.
Clinique de la Tuberculose	M. SIMONIN.
Clinique des voies urinaires	M. GUILLEMIN.
Electro-radiologie clinique	M. ROUSSEL.
Embryologie	M. DOLLANDER.
Histologie	M. LEGAIT.
Hydrologie Thérapeutique et Climatologie	M. MERKLEN.
Hygiène et Médecine sociale	M. MELNOTTE.
Médecine légale	M. HEULLY.
Médecine du travail et réadaptation profession- nelle et sociale	M. PIERQUIN.
Pathologie médicale	M. HERBEUVAL.
Physiologie	M. FRANCK.
Physique	M. BURG.
Stomatologie	M. HOUPERT.
Thérapeutique	M. LOUVOT.

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

Physiologie	M. GRANDPIERRE.
-------------------	-----------------

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Obstétrique	M. HARTEMANN J.
-------------------	-----------------

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	M. CAYOTTE.
Anatomie pathologique	M. RAUBER.
Bactériologie	M. DE LAVERGNE.
Chimie	M. PAYSANT.
Hygiène	M. SENAULT.
Pathologie expérimentale	M. DEBRY.
Pharmacologie	M. SADOUL.
Physiologie	M. LAMARCHE.
Physique	M. ARNOULD P.
	M. MARTIN (délégué).

AGRÉGÉS

Chirurgie	M. LOCHARD.
Chirurgie	M. BENICHOUX.
Chirurgie	M. SOMMELET.
Chirurgie	M. MICHON J.
Chirurgie	M. GROSDIDIER (délégué).
Dermatologie	M. BEUREY.
Médecine	M. FAIVRE.
Médecine	M. HARTEMANN P.
Médecine	M. DUREUX.
Médecine	M. LARCAN.
Médecine Infantile	M. PIERSON M.
Neurologie	M. ARNOULT G.
Neuro-chirurgie	M. LEPOIRE.
Obstétrique	M. RIBON.
Ophthalmologie	M. ALGAN.
Oto-rhino-laryngologie	M. GOSSEREZ.
Pneumo-ptisiologie	M. LAMY.

CHARGÉS DE COURS

Anatomie médico-chirurgicale	M. CAYOTTE maître de conférences, agrégé.
Cardiologie	M. FAIVRE, agrégé.
Chirurgie et orthopédie infantiles	M. BEAU, professeur.
Gériatrie	M. HERBEUVAL, professeur.
Hématologie et transfusion sanguine	M. REMIGY.
Maladies infectieuses	M. GERBAUT.
Maladies mentales	M. HACQUARD.
Ophthalmologie	M. CORDIER, agrégé libre.
Pathologie obstétricale	M. HARTEMANN J., professeur sans chaire.
Physiologie obstétricale	M. RICHON, agrégé libre.
Psychiatrie infantile	M. MEIGNANT.
Sémiologie et Propédeutique chirurgicales	M. ANDRÉ, agrégé libre.

AGREGES LIBRES

Chirurgie	M. PIETRA.
Chirurgie	M. ARNUF.
Chirurgie	M. ANDRÉ.
Obstétrique	M. RICHON.
Ophthalmologie	M. CORDIER.

ENSEIGNEMENTS COMPLÉMENTAIRES

Certificats d'études spéciales, diplômes et attestations d'études

Anesthésiologie	M. CHALNOT, professeur.
Bactériologie médicale et technique	M. BODART, professeur.
Biologie appliquée à l'Education physique et aux sports	M. HELLUY, professeur.
Cardiologie	M. MERKLEN, professeur.
Chirurgie générale	M. PERNOT, chargé de cours.
	M. CHALNOT, professeur.
	M. BODART, professeur.
Chirurgie et orthopédie infantiles	M. BEAU, professeur.
Dermato-vénéréologie	M. BEUREY, agrégé.
Endocrinologie clinique	M. HARTEMANN P., agrégé.
Génétique	M. NEIMANN, professeur.
Gynécologie	M. BERTRAND, professeur.
	M. DELACOTE, chargé de cours.

Hématologie	M. MICHON, professeur.
Hydrologie et climatologie	M. REMIGY, chargé de cours.
Hygiène, action sanitaire et sociale	M. MERKLEN, professeur.
	M. MELNOTTE, professeur.
	M. SENAULT, agrégé.
	M. DEBRY, agrégé.
Electro-radiologie	M. ROUSSEL, professeur.
Médecine aéronautique	M. MERKLEN, professeur.
	M. FRANCK, professeur.
	M. GRANDPIERRE, professeur.
Médecine générale	M. KISSEL, professeur.
	M. MICHON, professeur.
	M. HERBEUVAL, professeur.
Médecine légale	M. HEULLY, professeur.
Médecine du travail	M. PIERQUIN, professeur.
	M. KISSEL, professeur.
	M. ARNOULD G., agrégé.
Neuro-psychiatrie	M. MEIGNANT, chargé de cours.
	M. HACQUARD, chargé de cours.
Obstétrique	M. VERMELIN, professeur.
	M. HARTEMANN J., prof s. chaire.
	M. RIBON, agrégé.
Ophthalmologie	M. THOMAS, professeur.
	M. CORDIER, agrégé libre.
Oto-rhino-laryngologie	M. GRIMAUD, professeur.
Pédiatrie et puériculture	M. NEIMANN, professeur.
	M. PIERSON M., agrégé.
Pneumo-phtisiologie	M. SIMONIN, professeur.
	M. LAMY, agrégé.
	M. BRIQUEL, chargé de cours.
Rhumatologie	M. LOUYOT, professeur.
Sérologie	M. HELLUY.
Stomatologie	M. GOSSEREZ, agrégé.
Urologie	M. GUILLEMIN, professeur.

Secrétaire: N...

Le candidat répondra aux questions qui lui seront posées sur les diverses parties de l'enseignement médical.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

SERMENT

Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples, je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale et de l'honneur et de pratiquer scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades, mes confrères et la Société.

Je dédie ce travail:

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MON PÈRE

*Qu'il soit le témoignage de ma profonde
gratitude pour tout ce que je lui dois.*

A MON FRÈRE JEAN RACADOT

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris

*Qui fut toujours pour moi un exemple et
un ami.*

A MA SŒUR

A toute ma Famille

A tous mes Amis

A notre Président de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MICHON

Professeur de Clinique Médicale A
Directeur du Centre de Transfusion Sanguine de Nancy
Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous sommes sensible à l'honneur qu'il nous a fait en présidant notre Jury de Thèse. Il nous a accueilli avec bienveillance au Laboratoire Central des Cliniques et nous a initié à la technique de l'électrophorèse.

Ce travail est pour nous l'occasion de lui exprimer notre vive reconnaissance.

A nos Juges

MONSIEUR LE PROFESSEUR N. NEIMANN

Professeur de Clinique Médicale Infantile

Nous avons eu le plaisir de travailler dans son Service comme Externe et nous avons pu admirer la clarté de son enseignement et la finesse de son esprit. Nous le prions d'agréer l'expression de notre déférente gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. de LAVERGNE

Maître de Conférences Agrégé de Bactériologie

Directeur du Laboratoire Central des Cliniques

Depuis plusieurs années, nous travaillons dans son Laboratoire au sein d'une équipe qu'il dirige avec dynamisme et enthousiasme. L'intérêt qu'il a porté à notre Thèse et les facilités qu'il a su mettre en œuvre pour sa réalisation ont été pour nous le meilleur des encouragements. Nous l'en remercions vivement et l'assurons de notre fidèle attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. PAYSANT

Maître de Conférences Agrégé de Chimie Médicale

Il fut l'un de nos premiers Maîtres à la Faculté et nous avons pu alors apprécier la remarquable valeur de son enseignement.

C'est avec plaisir que nous l'avons retrouvé à la fin de nos études médicales lorsqu'il nous confia le sujet de ce travail. Il n'a ménagé ni ses conseils ni son temps pour nous aider à le mener à bien.

Nous lui exprimons notre profonde gratitude et l'assurons de notre entier dévouement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOULANGER

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur

*qui nous a accueilli avec bienveillance
dans son Laboratoire.
- En respectueux hommages.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. BISERTE

Professeur de Chimie Clinique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille

et au DOCTEUR R. HAVEZ

*qui nous ont fait l'honneur de nous consi-
dérer comme un de leurs élèves en nous gui-
dant dans l'élaboration et la réalisation de ce
travail et en nous prodiguant leurs précieux
conseils.*

*Nous tenons à leur témoigner notre inou-
bliable reconnaissance.*

A nos Maîtres dans les Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BEUREY (Externat 1956)

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLORENTIN (Externat 1957)

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CHALNOT (Externat 1957)

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. KISSEL (Externat 1958)

MONSIEUR LE PROFESSEUR N. NEIMANN (Externat 1958)

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. de LAVERGNE (Externat 1959)

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MELNOTTE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. LOUYOT

MONSIEUR LE DOCTEUR P. GERBAUT

A nos Maîtres de la Faculté

Notre respectueuse reconnaissance.

Aux Docteurs

J.-C. BURDIN
Biologiste des Hôpitaux

A. PETERS
Assistant des Hôpitaux

J. HARMAND
Attaché des Hôpitaux

J. DE WYN
et MADAME S. GILGENKRANTZ

*En remerciement pour ce qu'ils nous ont
appris au Laboratoire.
Avec notre vive gratitude.*

A G. PEROT et J. HAN

*qui, dans leurs propos de chaque jour,
n'ont cessé de nous témoigner leur amitié.*

A tout le Personnel du Laboratoire

Au Service de Photographie

*qui nous a facilité l'iconographie de ce
travail.*

INTRODUCTION

De nombreuses difficultés se manifestent dans l'étude des protéines sanguines car celles-ci possèdent des propriétés physico-chimiques souvent voisines; elles sont instables et ne peuvent être soumises à une technique trop brutale.

Ceci explique que nos connaissances en ce domaine se réduisaient, il y a une trentaine d'années, au seul fractionnement en Sérum-albumine et Sérum-globuline par l'emploi de sulfate de magnésium ou de sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Cependant, de nombreuses méthodes allaient permettre de rapides progrès. Certaines reposaient sur les précipitations fractionnées et n'étaient dans leur principe qu'un perfectionnement de l'ancienne séparation Sérum-albumine-Sérum-globuline: relargages aux sels neutres proposés par ROCHE et DERRIEN (1945), fractionnements par les solvants organiques: type de fractionnements de COHN (1947). D'autres s'appuyaient sur des propriétés plus complexes des protéines et nécessitaient un équipement important: Ultracentrifugation de SVEDBERG (1939), Electrophorèse libre de TISELIUS (1937). Ces procédés permettaient d'aborder utilement la séparation et l'identification des protéines. Mais la difficulté de leur réalisation n'autorisa pas à les appliquer en pratique courante et les réserva au domaine de la recherche. Néanmoins, par l'intérêt qu'elles suscitaient pour l'étude des protéines, ces méthodes allaient donner un essor nouveau aux tests de labilité colloïdale, plus faciles à mettre en œuvre pour les besoins de la clinique, et dont on se doutait, bien qu'ils exploraient les

modifications protéiques du sérum, ce que révélaient des études comparatives avec l'électrophorèse libre notamment. Il n'est pas étonnant, dans ces circonstances, qu'une technique peu onéreuse, facile à réaliser et à interpréter comme l'est l'électrophorèse sur papier, ait connu, dès sa découverte, un essor chaque jour croissant, ait constitué une rubrique nouvelle de la chimie clinique et ait fort utilement comblé une lacune dans le bilan biologique nécessaire à l'établissement d'un diagnostic et à la conduite d'une thérapeutique.

Récemment, deux auteurs danois, ARONSSON et GRÖNWALL (1) ont ouvert un champ nouveau d'investigation à l'électrophorèse sur papier par le simple emploi d'une solution électrolytique particulière : le tampon « TRIS-E.D.T.A.-BORATE » (tampon « T.E.B. »). Grâce à ce nouveau tampon, ils ont réussi à obtenir une séparation électrophorétique du sérum normal, supérieure à celle réalisée par l'emploi des tampons classiques. Le sous-fractionnement des alpha et bêta globulines qu'apporte cette innovation nous a paru particulièrement avantageux et nous a incité à appliquer cette technique d'électrophorèse en tampon « T.E.B. » à l'étude des sérums pathologiques, à en dégager les possibilités et l'intérêt sur le plan clinique, d'autant plus qu'aucun travail de ce genre n'a été entrepris jusqu'à ce jour.

HISTORIQUE

Le terme d'*Electrophorèse* fut introduit en 1906 par MICHAELIS (2) pour désigner la migration de micelles colloïdales sous l'influence d'un champ électrique. En biologie, actuellement, on appelle électrophorèse différentielle une technique de laboratoire permettant, sous l'influence du courant électrique, la séparation et le fractionnement de particules chargées électriquement. Elle s'applique donc aux composés amphotères et notamment aux acides aminés, aux protéines, aux phospholipides.

Il existe deux sortes d'électrophorèse différentielle:

— *L'électrophorèse libre* ou électrophorèse de frontières: les substances à séparer se trouvent en solution dans un tampon au pH judicieusement choisi et conducteur de courant; leurs migrations se font librement au sein de la solution tampon et leurs mobilités diverses, fonction de leurs charges respectives et de leurs masses, permettent leur séparation.

— *L'électrophorèse de zones*: la migration des différentes fractions à séparer repose sur le même principe que dans l'électrophorèse libre. Mais dans l'électrophorèse de zones, la migration, au lieu de se faire librement au sein du liquide, se fait sur un support poreux contenant ou imbibé d'une solution tampon appropriée. Ce support peut être de diverse nature:

soit un support solide: électrophorèse sur papier et électrophorèse sur poudre d'amidon,

soit un gel par exemple: électrophorèse sur gélose et électrophorèse sur gel d'amidon.

Il est intéressant de noter que la première électrophorèse pratiquée fut une électrophorèse de zones, alors que la

méthode devait prendre son essor par l'électrophorèse de frontières.

En 1907, en effet, FIELD et TEAGUE (3) isolèrent la toxine et l'antitoxine diphtériques sur un gel d'agar-agar par une séparation « électrophorétique » (sans que ce mot ne soit d'ailleurs prononcé). Mais l'idée d'un tel genre de fractionnement semble avoir été abandonnée au cours des années suivantes, peut-être à cause des difficultés rencontrées à l'époque, au cours de sa réalisation pratique. Il fallut attendre TISELIUS, dont le nom est désormais associé à la découverte de l'électrophorèse libre. Au cours de ses travaux échelonnés de 1925 à 1937 et dont sa thèse en 1930 relate les premiers résultats, le savant suédois contribua à un large développement de cette technique et en fit une méthode sûre de travail (4).

En même temps que se répandait l'électrophorèse libre (aux Etats-Unis en particulier, avec LONGWORTH), l'électrophorèse sur papier apparaissait pour la première fois en 1937 avec KÖNIG (5) qui eut l'idée d'étudier le pigment jaune du venin de serpent en se servant de papier comme support. Cette tentative allait à nouveau, comme pour l'électrophorèse de FIELD, en rester là pendant quelques années et ne réapparaître qu'à partir de 1944, simultanément à la naissance d'une autre technique, utilisant également le papier comme support, mais reposant sur un tout autre principe, la *Chromatographie* de partage sur papier.

Ces deux techniques sur papier, électrophorèse et chromatographie, ne devaient plus alors cesser de progresser, permettant — soit isolément, soit plus encore de façon couplée — l'étude de milieux biologiques, jusque là inaccessibles en pratique courante.

Pour son compte, l'électrophorèse sur papier devint, à partir de 1950, une méthode de plus en plus précieuse de l'étude des protéines sanguines, avec CREMER et TISELIUS, 1950 (6), DURRUM, 1950 (7), TURBA et ENENKEL, 1950

(8), GRASSMANN et HANNIG, 1950 (9), et BISERTE, 1950 (10).

Rapidement, on s'aperçut que l'électrophorèse sur papier offrait de nombreux avantages.

Sa réalisation extrêmement facile, la faible quantité de produit biologique utilisé (de l'ordre de quelques microlitres), le coût relativement faible de l'équipement nécessité, en font une méthode d'utilisation courante.

Elle peut, non seulement, révéler les protéines, mais par des colorations spécifiques, détecter les glycoprotéines, KOÏW et GRÖNWALL en 1952 (11), les lipoprotéines, SWAHN en 1952 (12), les phospholipides, KUNKEL et SLATTER en 1952 (13).

De plus, la possibilité qu'elle offre de récupérer isolément, par découpage et élution, les fractions protéiques séparées, lui apporte, par le jeu du couplage avec d'autres techniques (utilisation des isotopes, par exemple), la promotion au rang des méthodes de recherche.

Dès lors, l'électrophorèse sur papier ne cessa de se répandre. Si les techniques proposées furent nombreuses, les résultats restèrent sensiblement comparables. Cependant, l'emploi d'autres supports que le papier allait donner à l'électrophorèse une orientation nouvelle.

Ce fut, d'abord, l'utilisation de la gélose qui, contrairement au papier, ne présente pas de phénomène d'adsorption et permet une lecture facile par suite d'un fond totalement transparent. Mais son emploi allait surtout donner naissance en 1955, avec GRABAR et WILLIAMS (14) et SCHEIDEGGER (15) à l'immunoélectrophorèse, élégante méthode d'identification des fractions protéiques, alliant l'électrophorèse à des réactions antigéniques entre le liquide biologique à étudier et un immun-sérum correspondant.

Ensuite, ce fut l'emploi de gel d'amidon, SMITHIES en 1955 (16) qui, par sa seule présence, apporte des séparations électrophorétiques plus poussées et permet de saisir des variations intraspécifiques des protéines sériques.

CHAPITRE I

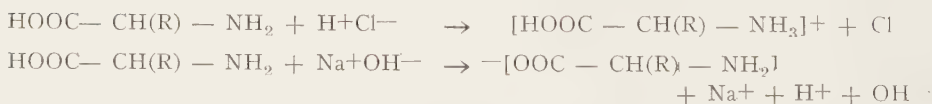
PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE SUR PAPIER EN TAMPON « T.E.B. »

Au cours de ce chapitre, nous envisagerons successivement le principe de l'électrophorèse différentielle et les facteurs qui influencent la migration des protéines. Parmi ceux-ci nous serons amené à étudier un tampon contenant du Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane*, de l'acide éthylènediamine-tétraacétique** et de l'acide borique, tampon qui est à la base de notre travail.

Principe de l'électrophorèse différentielle

Les protéines en tant que composés amphotères sont susceptibles en milieu aqueux, de subir une double ionisation au niveau de leurs fonctions carboxylique et aminée, et cette dissociation est variable suivant le pH auquel elles se trouvent soumises. En milieu alcalin, il y a « recul » de la dissociation ionique des groupements aminés au profit des seuls carboxyles, alors qu'en milieu acide l'inverse se produit.

On peut schématiser ce fait de la manière suivante :



Il existe un pH remarquable pour lequel il y a égalité de dissociation de la fonction acide et de la fonction basi-

* ou « Tris ».

** ou « E.D.T.A. » ou complexon II.

que. Ce pH est appelé point isoélectrique ou pH_i . Pour cette valeur particulière de pH, les deux dissociations coexistant, la protéine est électriquement neutre. Au contraire, en milieu alcalin, ou plus exactement à pH supérieur à son pH_i , elle est chargée négativement et, en milieu acide, ou plus exactement à pH inférieur à son pH_i , elle est chargée positivement.

Placée alors dans un champ électrique et à un pH autre que son pH_i , elle est attirée par le pôle de signe contraire à sa charge, ceci en fonction de l'intensité du champ électrique, de la charge qu'elle porte, de la forme et de la taille moléculaires qu'elle possède, facteurs qui ont tendance à s'opposer à son déplacement. La vitesse de déplacement d'une protéine dans les conditions que nous venons d'indiquer, porte le nom de « *mobilité électrophorétique* ». Elle se définit par le chemin parcouru par la protéine et est exprimée en centimètre par seconde, pour un champ électrique unitaire de un volt par centimètre.

Or, chaque protéine possède une mobilité qui lui est propre. C'est sur ce phénomène que repose l'électrophorèse différentielle. Celle-ci est en effet une méthode de séparation des protéines basée sur la différence de migration dans un champ électrique.

Facteurs influençant la mobilité d'une protéine

En fait, de nombreux facteurs influent sur la mobilité des protéines. Ils tiennent aux conditions expérimentales que l'on s'impose. Qu'une de ces conditions vienne à varier — changement du support, modification du tampon — le résultat est tout différent. Nous en voulons pour exemple la différence qui existe entre une électrophorèse sur papier, une électrophorèse sur gélose et une électrophorèse sur gel d'amidon (MORETTI et Coll., 17). Il est donc absolument nécessaire de se fixer des conditions expérimentales strictes si l'on veut obtenir des résultats constants et reproductibles.

L'utilisation d'un support solide a permis de substituer l'électrophorèse de zones, plus facilement réalisable et moins onéreuse, à l'électrophorèse en veine liquide (type TISELIUS) où la stabilisation des frontières s'établissait uniquement par la pesanteur. Les supports constitués par des gels (gel d'agar-agar, gel d'amidon) présentent un intérêt certain. Par leur haute teneur en liquide qui peut atteindre 98 et 99 %, ils se rapprochent de l'électrophorèse libre, tout en conservant les avantages de l'électrophorèse de zones (possibilité de récupération des fractions isolées); cependant la préparation de ces gels et l'exécution des électrophorèses sont indiscutablement assez délicates. Beaucoup plus courant est l'emploi de papier filtre. Mais celui-ci intervient sur la migration des protéines (comme tout autre support) par sa structure, par les phénomènes électroendosmotiques dont il est le siège, et par son pouvoir adsorbant.

— *Par sa structure*: Celle-ci doit être rigoureusement homogène.

— *Par des phénomènes électroendosmotiques*: Le papier est, en effet, porteur de charges électriques négatives (par ses groupements carboxyliques). Aussi, s'il était « libre », il migrerait en bloc vers la cathode. Ne pouvant le faire, un courant liquidien appelé « Electroendosmose » se produit en sens inverse et agit donc directement sur le déplacement des protéines.

— *Par son pouvoir adsorbant*: C'est ce que l'on désigne sous le nom de « phénomène de traînée » et qui se manifeste par la présence de protéines depuis la ligne de dépôt du sérum jusqu'aux diverses fractions. Ce phénomène s'atténue par l'emploi de solutions tampons ayant un pH supérieur au pHi des protéines étudiées, lesquelles se comportent dans ce cas comme des anions repoussés par les charges négatives du papier.

Le dispositif d'électrophorèse n'est pas à négliger dans l'estimation de la mobilité des protéines: par suite de l'effet Joule, surtout important au sein du papier, il se pro-

duit un échauffement de celui-ci, d'où une évaporation continue du tampon à son niveau. Par capillarité, ce tampon évaporé est remplacé au fur et à mesure par du tampon provenant des cuves. Ainsi se trouvent réalisés deux courants liquidiens allant des extrémités du papier vers son centre où ils s'annulent, et appelés « courants de rhéophorèse ». Ils ont deux conséquences: d'une part ils entraînent l'accumulation de substances non volatiles au milieu du papier, d'autre part ils favorisent ou ils retardent le déplacement des protéines suivant qu'elles migrent dans une moitié ou l'autre du papier. Les différents types d'appareils à électrophorèse tiennent compte de ce phénomène:

— ou bien ils le combattent: c'est le type d'appareil « refroidi » où l'on cherche à supprimer toute évaporation (électrophorèse à basse température et électrophorèse au sein d'un liquide inerte, non miscible à l'eau).

— ou bien ils l'atténuent: c'est le type d'appareil à évaporation réduite*, GRASSMANN et HANNIG (18). La chambre d'électrophorèse est d'un petit volume et les bandes de papier sont tendues horizontalement.

— ou bien ils le favorisent: c'est le type d'appareil à évaporation optimale ou contrôlée. DURRUM (19), MACHEBOEUF, DUBERT et REBEYROTTE (20). La chambre d'électrophorèse se caractérise par son grand volume, les bandes de papier sont tendues sur un chevalet, en position de V renversé.

Le rôle du tampon est capital puisqu'il intervient par son pH, par sa force ionique et par la nature de ses constituants.

— Le pH du tampon détermine la nature des charges électriques des protéines en solution, d'après le principe même de l'électrophorèse.

I

— La force ionique ou — est une caractéristique pro-

*Type d'appareil ELPHOR, commercialisé par la Maison BENDER et HOBEIN, Munich.

pre aux solutions tampons. Sa signification est donnée par la formule:

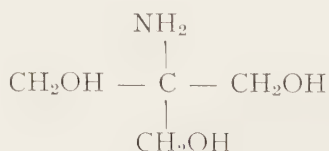
$$\frac{I'}{2} = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2$$

où c_i représente la concentration individuelle de chaque ion et z_i sa valence. Il faut savoir qu'une baisse de la force ionique entraîne une augmentation de la mobilité des protéines et du courant d'électroendosmose.

— Les constituants qui entrent dans la composition des tampons sont très variables et extrêmement nombreux. Leur choix est déterminé par les problèmes que l'on cherche à résoudre et par la nécessité d'obtenir des solutions ayant une faible force ionique compatible cependant avec le maintien et la stabilité du pH. Exceptionnellement, certains constituants sont recherchés parce que formant un complexe avec les substances à étudier (MICHLE, 21). En fait, le tampon le plus souvent utilisé, celui qui sert de référence aux autres tampons, est à base de véronal sodé. Son pH est de 8,6 ou 8,9 et sa force ionique 0,1, plus rarement 0,05.

Nous voudrions insister à présent sur plusieurs composés susceptibles, en entrant dans la composition de divers tampons, de leur conférer certaines propriétés particulières.

Nous envisagerons en premier lieu le « *Tris* ». Commercialisé sous le nom de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane, son nom chimique est 2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-Propanediol, sa formule:



Il appartient au groupe des composés aminés et hydroxy-

lés dont deux autres représentants voisins sont le « 2-Amino-2-Méthyl-1-Propanol » et le « 2-Amino-2-Méthyl-1,3-Propanediol ».

Son poids moléculaire est : 121,14.

Il se présente sous forme d'une poudre blanche d'odeur légèrement ammoniacale. Son point de fusion est 171-172° C. Très soluble dans l'eau, on peut en dissoudre jusqu'à 800 g par litre. Il est alcalin : à la concentration de 0,1 M en solution aqueuse, son pH est 10,4.

Mais ses deux propriétés essentielles, qui font tout son intérêt en électrophorèse, sont d'une part son fort pouvoir tampon, d'autre part sa très faible force ionique.

— Sa force ionique extrêmement basse peut, en effet, être comptée pour négligeable et il convient d'additionner de sels minéraux ou d'acides les solutions tampons dans lesquelles il entre, afin d'assurer leur compatibilité avec la réussite d'une bonne migration électrophorétique (tout en devant être faible, la force ionique d'un tampon ne doit pas descendre en dessous de certaines limites, de l'ordre de 0,05).

— Son pouvoir tampon est excellent. Comparé à une solution de véronal sodé (0,1 M), une solution de « Tris » (0,05 M) nécessite dix fois plus d'acide chlorhydrique pour obtenir une même variation de pH, pour des pH compris entre 8 et 9 (voir tableau ci-dessous). La stabilité maxima de son pH se situe, en effet, à $\text{pH} = 8,02$ (à 25°C) RAPP et MEMMINGER (22).

Si le Tris ne peut suffire à lui seul pour la fabrication d'un tampon pour électrophorèse, il confère à la solution, par sa présence, un pouvoir tampon suffisant pour permettre l'addition en quantité réduite d'une autre substance dont le seul rôle sera d'amener la force ionique à une valeur appropriée. Au contraire, en l'absence de « Tris », il eût été nécessaire d'utiliser une solution tampon à une concentration relativement importante, à seule fin d'obtenir un effet tampon semblable, ce qui aurait eu pour consé-

quence d'augmenter parallèlement et de façon inopportune la force ionique de la solution.

Depuis longtemps, le « Tris » est connu des biologistes qui l'utilisent pour extraire certains enzymes à des pH déterminés. Mais les premières applications dans le domaine de l'électrophorèse, à notre connaissance, sont dues à RICE, STAHMANN et ALBERTY (23) qui, en 1954, ont étudié le comportement électrophorétique de complexes formés entre la sérum-albumine bovine et un polypeptide à base de lysine, à l'aide de différentes solutions tampons, dont une constituée par du « Tris » + HCl de pH 7.9 et de force ionique 0.05. Par la suite, d'autres tampons comportant du « Tris » ont été employés pour effectuer des électrophorèses de divers enzymes: diaphorase, Nerina SAVAGE, 1957 (24), lipase pancréatique, SARDA et Coll., 1958 (25), fumarase, SHAVIT, ALBERTY coll., 1958 (26). Mais le but de ces auteurs était plus d'utiliser des tampons qu'ils connaissaient que d'expérimenter une solution électrolytique particulière. Par contre, POULIK, 1957 (27), ARONSSON et GRÖNWALL, 1958 (28), CAMPBELL et coll., 1959 (29) et RAPP et MEMMINGER, 1959 (30) ont véritablement introduit le « Tris » en électrophorèse, en s'attachant à l'intérêt qu'il peut présenter à des fins de meilleures séparations électrophorétiques des protéines sériques.

Une autre catégorie de substances sont dignes de retenir l'attention dans le choix des composants d'une solution tampon électrolytique: ce sont les *ions borates*.

En se combinant avec la fraction glucidique d'une glycoprotéine (en formant un complexe avec les hydroxyles glucidiques, comme dans la technique de BOESEKEN), ils en modifient l'ionisation et par suite la mobilité électrophorétique.

FORSTER et STACEY en 1953 (31), puis NORTHCOTE en 1954 (32), ont précisé comment se formait le complexe entre l'ion borate et les groupements hydroxyles des mono

et oligosaccharides. GOLDWASSER et MATHIEWS en 1955 (33), ont montré expérimentalement sur trois glycoprotéines isolées à l'état pur, l'Orosomucoïde, la Sérumalbumine bovine et une Antihyaluronidase, que l'action des ions borates avaient pour conséquence une augmentation de la mobilité électrophorétique de ces protéines. Enfin, la même année, ABDEL-WAHAB et coll. (34) ainsi que CONSDEN et POWELL (35) ont mis en évidence le dédoublement des α_2 et β globulines par l'emploi de tampon borate.

Récemment ARONSSON et GRÖNWALL, puis à leur suite CAMPBELL et coll. (36) ont introduit l'*acide éthylènediamine-tétraacétique* (E.D.T.A.) dans un tampon à base de « Tris ». Ce corps ayant une force ionique négligeable en même temps qu'un pouvoir tampon limité, on peut se demander quel est son intérêt. Cependant ARONSSON et GRÖNWALL (37) lui reconnaissent le mérite de dédoubler les α_2 globulines en deux fractions. Il est difficile de préciser avec certitude le mécanisme auquel il faut attribuer ce dédoublement des α_2 globulines. L'E.D.T.A. faisant partie des agents chélateurs, il est possible qu'il masque, par la formation de complexes, certains éléments métalliques qui seraient transportés par des protéines, ou qui se trouveraient à titre d'impuretés dans la solution tampon mais qui, de toutes façons, seraient nuisibles à une bonne séparation des différentes fractions protéiques.

Ce sont ces trois produits dont nous avons essayé d'analyser le mode d'action: le « TRIS », l'« E.D.T.A. », les ions « BORATES » — que ARONSSON et GRÖNWALL (38) ont fait entrer dans la composition du nouveau tampon « T.E.B. » qu'ils proposent pour l'étude des protéines sériques et auquel ils donnent la formule suivante:

— TRIS	60,5 g (soit 0,05 M)
— E.D.T.A.	6 g (soit 0,021 M)
— Acide borique	4,6 g (soit 0,075 M)
— Eau distillée	q. s. 1000 ml

Le pH de ce tampon est 8,9 et sa force ionique approximativement 0,08. Outre son excellent pouvoir séparateur qui en fait tout l'intérêt, puisqu'il a permis à ARONSSON et GRÖNWALL d'obtenir neuf composants protéiques en électrophorèse sur papier, et jusqu'à douze fractions en électrophorèse sur acétate de cellulose, il présente certains avantages appréciables: il ne se pollue pas, la stabilité de son pH est remarquable de telle sorte qu'il peut être préparé à l'avance et conservé longtemps.

Nous voudrions insister en terminant ce chapitre sur l'important pouvoir tampon des solutions électrolytiques contenant du « Tris ». Pour ce faire, nous avons établi les courbes de neutralisation des trois solutions suivantes:

- Solution (V.): Véronal sodé 0,1 M
(le pH étant ajusté à 8,9 par HCl)
- Solution (T.E.B.): Tampon « T.E.B. »
- Solution (T): « Tris » 0,05 M

et nous avons cherché quelles quantités de HCl il fallait ajouter à 100 ml de chacune de ces solutions pour faire décroître son pH progressivement, par paliers, jusqu'à 8.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.

*dont la formule est identique à la solution que nous employons pour électrophorèse en tampon véronal.

TABLEAU I

Solutions	(V.)	(T.E.B.)	(T.)
pH initial	8,9	8,9	10,4 environ
Quantité de HCl pour amener les solutions à pH = 8,9	0	0	8 cc HCl $\frac{N}{1}$
Quantité de HCl pour amener les solutions à pH = 8,75	2,5 cc HCl $\frac{N^*}{10}$	3 cc HCl $\frac{N^*}{1}$	2,9 cc HCl $\frac{N^*}{1}$
à pH = 8,50	6 cc »	8,5 cc »	8,2 cc »
à pH = 8,25	10,8 cc »	14,5 cc »	15 cc »
à pH = 8,00	16,7 cc »	20,5 cc »	21,8 cc »

* Pour respecter une semblable dilution des diverses solutions, nous avons été amené à utiliser de l'acide chlorhydrique normal pour les solutions (T.) et (T.E.B.) et de l'acide chlorhydrique décimormal pour la solution (V.)

Ces résultats montrent que les solutions à base de « Tris » (solutions T. et T.E.B.) possèdent entre les pH 8,9 et 8 un pouvoir tampon plus de dix fois supérieur à celui d'une solution véronal de même pH.

CHAPITRE II

TECHNIQUE DE L'ELECTROPHORESE EN TAMPON « T.E.B. »

Pour une bonne standardisation de nos résultats, nous avons toujours utilisé la même méthode. Celle-ci est une adaptation au tampon « T.E.B. » de la technique que nous employons en tampon véronal. Nous l'exposons ci-dessous. Dans un second paragraphe, nous en ferons la discussion.

I. — Technique personnelle

1) LE MATÉRIEL

L'appareil à électrophorèse est du même type que celui commercialisé par ELPHOR, avec chambre humide à évaporation limitée. Il peut recevoir trois bandes de papier. Le redresseur fournit un courant continu et stabilisé, réglable de 0 à 500 volts.

Le support utilisé est de deux sortes, soit le papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl, sous forme de bande de 31,5 cm sur 4 cm, soit l'acétate de cellulose Bacht n° L 546*, de dimensions 34 cm sur 5 cm.

Le colorant pour la révélation des protéines est l'Amidoschwarz**, selon la méthode préconisée par GRASSMANN et HANNIG (39).

— Noir Amido 12 B N	5 g
— Méthanol pur	450 ml
— Acide acétique glacial	50 ml

* fourni par la Maison OXOÏDE (Ltd)

** fourni par la Maison KUHLMANN.

Pour les lipoprotéines, nous avons pratiqué la méthode de coloration de SWAHN (40) utilisant le Noir Soudan à saturation dans l'éthanol à 60° : 500 mg de noir Cérol B* sont dissous dans 500 ml d'éthanol à 60° par ébullition pendant 20 minutes dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux. On filtre à trois reprises. Le colorant est prêt à être utilisé et le demeure pour une période n'excédant pas 72 heures.

Pour les glycoprotéines, nous avons utilisé la technique de l'acide périodique — réactif de SCHIFF, de KOÏW et GRÖNWALL (41).

La solution d'acide périodique est préparée en dissolvant 1,84 g de parapériodate de sodium dans 18,8 ml d'acide sulfurique normal et 11,2 ml d'eau distillée, puis en ajoutant

N

tant 15 ml d'acétate de sodium — et 100 ml d'alcool éthy-

5

lique absolu. On filtre. La solution se conserve à froid et à l'obscurité, dans un flacon bouché, pendant une semaine environ.

La solution réductrice s'obtient en dissolvant 5 g d'iodure de potassium et 5 g d'hyposulfite de sodium dans 100 ml d'eau distillée et en ajoutant 150 ml d'alcool éthylique absolu et 2,5 ml d'acide chlorhydrique concentré pur. Cette solution doit être préparée extemporanément.

La préparation du réactif de SCHIFF est plus délicate. (Technique LAURELL et SKOOG):

4 g de fuchsine basique* sont dissous dans 800 ml d'eau distillée bouillante. On laisse refroidir jusqu'à 50° C environ, et on ajoute 8 g de métabisulfite de potassium et 20 ml d'acide chlorhydrique 2 N. On agite pour mélanger l'ensemble et on laisse reposer toute une nuit en glacière. On ajoute alors 2 g de charbon adsorbant (Norit par exem-

* fourni par la Maison KUHLMANN.

ple), on agite et on filtre le mélange; 22 ml d'acide chlorhydrique 2 N sont ajoutés au filtrat qui, clair et incolore, doit être conservé en glacière. (Afin d'éviter tout titrage du réactif de SCHIFF après usage, il convient d'ajouter 4 g de métabisulfite de potassium par 100 ml de réactif utilisé).

Le tampon a un pH de 8,9 et une force ionique de 0,08. Sa composition est la suivante:

— « TRIS » ou Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane	60,5 g
— « EDTA » ou Acide Ethylènediamine tétraacétique (encore désigné sous le nom de Complexon II)	6 g
— Acide borique	4,6 g
— Eau distillée: q.s.p.	1000 ml

Le sérum doit être frais (prise de sang effectuée le jour même de l'électrophorèse de préférence). A l'aide d'une micropipette capillaire, on mesure 15 microlitres pour un protéinogramme, 40 microlitres pour un glucoprotéinogramme ou un lipoprotéinogramme (l'acétate de cellulose se présentant sous des bandes plus larges, on peut augmenter légèrement les quantités: 20 microlitres pour un protéinogramme).

2) MODE OPÉRATOIRE

Que l'on utilise du papier Schleicher et Schüll ou de l'acétate de cellulose, les *manipulations préliminaires* sont identiques et s'effectuent comme suit: Sur la surface lisse du papier (que l'on doit repérer à l'avance) ou sur la surface indiquée par la lettre « O » sur l'acétate de cellulose, sont tracés, à 9 cm de l'une des extrémités et perpendiculairement au grand axe, 2 traits parallèles, distants l'un de l'autre de 2 mm et restant éloignés des bords latéraux du papier de 0,5 cm au minimum (Ils serviront de repère pour le dépôt du sérum). La bande de papier ou d'acétate de cellulose est imbibée de solution tampon et essorée entre deux papiers-filtre. Elle est tendue sur le support de l'appareil à électrophorèse en l'humectant légèrement aux points de contact avec le support pour faciliter son adhé-

rence et elle est placée de manière à ce que les repères soient situés à 3 cm du bord libre du support.

Le sérum est alors déposé entre les deux traits de repère de façon homogène en promenant doucement l'extrémité de la pipette au contact du papier. Il n'y a pas d'inconvénient à ce que le sérum, sous l'effet de la diffusion entre le moment du dépôt et celui de la mise en route de l'appareil, migre de 0,5 à 0,8 mm vers le centre de la feuille (ce qui se visualise lorsque le sérum est teinté en jaune par de la bilirubine). Néanmoins, il y a intérêt à éviter toute perte de temps inutile.

La migration s'effectue sous une tension de 6,5 volts/cm pour le papier Schleicher et Schüll, et de 6 volts/cm pour l'acétate de cellulose; le voltage aux bornes est réglé à 150 volts environ.

Après 15 minutes de migration, la différence de potentiel est contrôlée au voltmètre entre les deux extrémités horizontales du support (soit sur une longueur de 22,5 cm). Si besoin est, elle est réajustée à 146 volts pour le papier Schleicher et Schüll et 132 volts pour l'acétate de cellulose. La durée est de 18 heures pour l'acétate de cellulose et de 19 heures pour le papier Schleicher et Schüll.

Lorsque l'électrophorèse est terminée, les bandes de papier (ou d'acétate de cellulose) sont séchées à 37° C en les laissant sur leur support. *La fixation* est ensuite réalisée en les plaçant horizontalement sur un papier filtre et en les soumettant à une température de 100° C pendant 30 minutes au minimum.

Pour la révélation des protéines, les bandes à colorer sont placées dans un bac qui permet d'en juxtaposer (sans superposition) 5 à la fois et qui contient 500 ml de colorant (Amidoschwarz*). La coloration dure 10 minutes. Toutes les 2 à 3 minutes, le bac est agité doucement à la main. Les lavages destinés à éliminer l'excès d'Amidoschwarz et à décolorer le fond du papier ou de l'acétate

*Amidoschwartz: Voir préparation du colorant, page 16.

de cellulose s'effectuent dans du méthanol-acide acétique (9/1). Quatre ou cinq lavages sont nécessaires, répartis sur 24 heures pour le papier Schleicher et Schüll, et sur 12 heures pour l'acétate de cellulose. Les bandes sont alors sèches à l'air libre et prêtes à être enregistrées au photomètre.

La coloration des lipoprotéines s'obtient en plongeant les bandes de papier dans 500 ml de colorant (Noir Soudan*) pendant 4 heures. Trois lavages de 15 minutes chacun dans l'éthanol à 60° décolorent le fond du papier et les bandes sont séchées à l'air libre comme précédemment.

Signalons dès à présent que l'acétate de cellulose, soudanophile, ne se prête pas à une telle coloration.

La coloration des glycoprotéines, pour être menée à bien, nécessite une standardisation minutieuse de la méthode. Nous ne l'avons pratiquée que pour des électrophorèses sur papier Schleicher et Schüll. Il convient, avant d'oxyder les glycoprotéines par l'acide périodique, d'éliminer de façon à peu près totale la solution tampon qui imprègne les bandes de papier, sinon l'acide périodique est neutralisé et aucune coloration n'apparaît. Cette précaution est indispensable à la réalisation des glycoprotéinogrammes en tampon « T.E.B. ». Pour ce faire, on peut simplement laver les bandes de papier à l'eau distillée, mais le mieux

N

est de les passer dans un bain d'acide acétique — ou d'aci-

I

N

de sulfurique — pendant 5 minutes.

I

La conduite de la coloration est ensuite semblable à celle que l'on suit pour la révélation des glycoprotéinogrammes en tampon véronal:

Après déshydratation des bandes par l'alcool éthylique absolu (5 minutes), celles-ci sont placées pendant 5 minu-

*Noir Soudan: Voir préparation du colorant, page 17.

tes dans la solution d'acide périodique*, lavées pendant 2 minutes dans de l'alcool éthylique à 70 pour 100, passées dans la solution réductrice* et à nouveau lavées dans de l'alcool éthylique à 70 pour 100.

On procède alors à la coloration dans le réactif de SCHIFF* (15 minutes) et on rince les bandes de papier dans trois bains d'eau sulfitée de 5 minutes chacun. Elles sont alors séchées à l'air libre et peuvent être conservées à l'obscurité et à l'abri de l'humidité.

II. — Discussion de la méthode

Hormis quelques détails non signalés par ARONSSON et GRÖNWALL (42), c'est à la technique de ces auteurs que nous nous sommes arrêté. Néanmoins, telle qu'elle, elle ne nous a pas toujours donné entièrement satisfaction (en particulier le fractionnement des bêta globulines s'est révélé souvent défectueux avec le papier Schleicher et Schüll). Aussi, avons-nous cherché quelles étaient les conditions optimales à respecter. Exceptées les expériences sur le choix du support, c'est toujours au papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl que nous nous sommes adressé au cours de cette étude.

Le choix du support. Nous avons essayé entre autres les papiers WHATMAN n° 1 et Schleicher et Schüll (2043 B). Ils ne nous ont pas donné de meilleurs résultats que le papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl.

Par contre, l'acétate de cellulose préconisé par KOHN (43) s'est révélé bien supérieur; la séparation des protéines en 8 fractions y est constante: 2 α_2 globulines et 3 bêta globulines. Parfois même, nous avons obtenu deux composants supplémentaires: l'un provenant d'un dédoublement des α_1 globulines, l'autre migrant au delà de l'albumine. L'apparition de ce dernier est due à la bonne décoloration de fond du support qui redevient parfaitement

*Voir préparation des solutions pages 17 et 18.

blanc. C'est un autre intérêt à signaler à l'avantage de l'acétate de cellulose par rapport aux papiers couramment utilisés en électrophorèse: son fond se décolore parfaitement.

Il présente cependant quelques inconvénients. D'une manière générale, il est malaisé à manipuler: il est difficile à imbiber de solution tampon et à placer sur le support par suite de sa rigidité. Il doit être soigneusement essoré avant le dépôt du sérum, sinon celui-ci — son absorption par l'acétate de cellulose étant lente — diffuse en surface. Après fixation, il se casse facilement par suite d'une fragilité plus grande qu'il acquiert à la chaleur. Si on n'y prend garde, lorsqu'on le fait sécher après coloration il se plisse, aussi il convient de le placer entre deux papiers-filtre et sous presse. Soudanophile, il est impossible de l'utiliser pour effectuer des lipoprotéinogrammes.

Enfin, il est d'un prix onéreux.

Ces divers inconvénients en restreignent donc l'emploi, malgré les avantages indéniables qu'il présente par ailleurs sur le papier.

Le sérum doit être frais. Un sérum vieux de plusieurs jours migre mal. La séparation des bêta globulines en 3 fractions est mauvaise. Pour la même raison, la quantité de sérum doit être minime. Néanmoins, elle doit être suffisante pour permettre une bonne coloration. Or, le tampon « T.E.B. » atténue la coloration des protéines par l'Amidoschwarz, si bien que l'on se trouve limité par deux exigences opposées. Après de nombreux essais, la quantité de 15 microlitres de sérum nous a semblé optimale pour la réalisation des protéinogrammes.

Le tampon a été étudié sous deux aspects:

Tout d'abord, d'un point de vue *quantitatif*. Sans que nous soyons parvenu à nous faire une idée définitive, il nous a semblé que la quantité optimale de tampon utilisé devait être aussi grande que possible. Aussi avons-nous rempli chaque cuve à électrophorèse suivant sa capacité

maximale: 400 ml par cuve. Mais une condition est primordiale pour obtenir de bonnes électrophorèses: plus que pour le tampon véronal, l'égalisation des niveaux dans les deux cuves doit être parfaite.

Ensuite, d'un point de vue *qualitatif*. Nous avons essayé deux tampons contenant les constituants dans le même rapport entre eux, mais plus ou moins dilués, à savoir:

	(A)	(B)
Tris	60,5 g	60,5 g
Complexon II	6 g	6 g
Acide borique	4,6 g	4,6 g
Eau distillée q.s.p.	1100 ml	900 ml

Ces deux tampons possèdent un pH apparemment non modifié et égal à 8,9. Les électrophorèses effectuées avec la solution A se sont révélées plus étalées avec des zones plus floues et difficilement interprétables, tandis que celles réalisées avec la solution B ressemblaient aux électrophorèses en tampon « T.E.B. » habituel, si ce n'est des séparations plus ramassées sur elles-mêmes.

L'influence *du voltage est certaine*. Nous avons eu l'occasion de l'étudier en pratiquant des électrophorèses sous une tension de 170-180 volts (soit 7 à 7,5 volts/cm): les dédoublements des alpha et bêta globulines deviennent alors difficilement visibles.

En ce qui concerne le *choix du colorant*, nous avons opté pour l'Amidoschwarz, car c'est un des seuls qui permette de colorer uniformément chaque groupe de protéines. C'est pour cette même raison que nous n'avons utilisé qu'exceptionnellement le Bleu de Bromophénol* qui offre cependant l'avantage de donner une décoloration à peu près totale du fond du support, car son emploi nécessite un facteur de correction pour l'estimation des globulines.

*Préparation de la solution colorante:

Bleu de Bromophénol	100 mg
Chlorure mercurique	50 g
Acide acétique glacial	50 ml
Eau distillée q. s. p.	1000 ml

Nous voudrions néanmoins insister sur un point qui nous a semblé particulier à l'emploi du tampon « T.E.B. » : c'est, d'une part, l'obligation d'augmenter sensiblement les quantités de sérum et de doubler les temps de coloration pour obtenir des révélations satisfaisantes; d'autre part, la nécessité de renouveler fréquemment les colorants (500 ml d'Amidoschwarz ne colorent que 50 bandes d'électrophorèse ; 500 ml de Bleu de Bromophénol en solution aqueuse ne colorent que 3 bandes). Nous pensons que cet inconvénient provient de l'énorme pouvoir tampon alcalin du « Tris ».

De ces quelques considérations, nous retiendrons que les électrophorèses pratiquées en tampon « T.E.B. » donnant les meilleurs résultats sont celles effectuées avec l'acétate de cellulose. Si l'on est amené à utiliser un papier du type Schleicher et Schüll, il convient de prendre diverses précautions: limiter les quantités de sérum à 15 microlitres, emplir au maximum les cuves de solution tampon en ayant bien soin d'égaliser leurs niveaux, ne pas utiliser des différences de potentiel supérieures à 6,5 volts par cm. Enfin, quel que soit le colorant utilisé, il doit être fréquemment renouvelé.

CHAPITRE III

L'ELECTROPHORESE DU SERUM NORMAL EN TAMPON « T.E.B. »

Au cours de ce chapitre, nous donnons le résultat d'électrophorèses du sérum normal effectuées en tampon « T.E.B. ». Nous avons considéré comme « sérum normal » le mélange de dix sérums provenant de sujets adultes en bonne santé. Dans une première partie, nous envisageons l'étude du protéinogramme, du lipoprotéinogramme et du glycoprotéinogramme. Dans une seconde partie, nous montrons, comparativement au sérum normal de l'adulte, les variations du spectre protéique en fonction de l'âge: nouveau-né, nourrisson de 3 à 6 mois et vieillard.

Le protéinogramme du sérum normal

A — DESCRIPTION

Effectué dans les conditions que nous avons précédemment indiquées, le protéinogramme du sérum normal en tampon « T.E.B. », diffère notablement de celui obtenu en tampon véronal de pH 8,9. Nous y trouvons en effet, huit bandes protéiques au lieu de cinq (Figure 1).

L'électrophorèse en tampon véronal que nous présentons à titre de comparaison (figure 1) a été réalisée selon le mode opératoire suivant: — le tampon est obtenu par dissolution de 10,13 g de véronal sodique dans 1 litre d'eau distillée, le pH est rajusté à 8,9 par addition de 2,5 ml envi-

N

ron d'acide chlorhydrique — , — le dépôt de 10 micro-
I

litres de sérum normal est effectué sur du papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl, à 9 cm du bord cathodique de la bande, — la migration se poursuit pendant 10 heures sous une tension de 120 volts aux bornes de l'appareil, — le séchage, la fixation et la révélation par l'Amidoschwarz sont effectués selon le même protocole que pour les électrophorèses en tampon « T.E.B. » et ont été décrits précédemment (page 19). (Une légère différence est cependant à noter: la coloration des électrophorèses en tampon véronal ne demande que 5 minutes au lieu des 10 minutes nécessaires à la révélation des électrophorèses en tampon « T.E.B. »).

Si nous détaillons les électrophorèses effectuées en tampon « T.E.B. », que ce soit sur papier Schleicher et Schüll ou sur acétate de cellulose, nous observons successivement dans l'ordre de leur mobilité décroissante: la Sérum-albumine, reconnaissable par son importante coloration, les α_1 globulines, les α_2 globulines, dédoublées en deux sous-fractions, les bêta globulines, représentées par trois bandes distinctes, et les gamma globulines, proches du point de dépôt du sérum. Les différentes fractions protéiques, de la Sérum-albumine aux gamma globulines, s'étalent sur une longueur variant de 9 à 12 ou 13 cm selon les électrophorèses envisagées.

1° *La Sérum-albumine*

C'est une bande large, bien colorée; elle est plus étalée qu'en tampon véronal; elle possède une limite franche dans sa portion lente; au contraire, l'intensité de sa coloration diminue progressivement en un dégradé vers sa partie rapide qui se termine par un flou et non par un front nettement délimité, comme c'est le cas sur l'électrophorèse-témoin pratiquée en tampon véronal: il en résulte une asy-

métrie de la courbe d'enregistrement. Cette asymétrie n'est pas particulière au tampon « T.E.B. », mais se rencontre également avec des tampons tels que le « Tris-acide chlorhydrique » et le « Tris-acide acétique » (ARONSSON et GRÖNWALL (44)) ou des tampons à base de borate (HAVEZ et BISERTE (45)).

2° *Les Alpha₁ globulines.*

Leur bande est mince, bien visible cependant. Elle est à la fois nettement séparée de la Sérum-albumine et des alpha₂ globulines.

3° *Les Alpha₂ globulines.*

Les deux bandes suivantes sont inégales : la plus rapide est peu colorée, parfois délicate à repérer sur le papier Schleicher et Schüll. La plus lente, au contraire, est nette, toujours bien visible.

Elles correspondent aux alpha₂ globulines du tampon véronal, et nous pensons être en droit de l'admettre : d'une part, elles sont colorées toutes deux par la technique de l'acide périodique-réactif de Schiff ; d'autre part, nous avons eu l'occasion d'observer leur dédoublement progressif à partir d'une seule zone par l'emploi de quantités variables de sérum. Un sous-fractionnement comparable est d'ailleurs obtenu avec d'autres tampons : « Tris-E.D.T.A. », ARONSSON et GRÖNWALL (46), « Borate », ABDEL-WAHAB et coll. (47), CONSDEN et POWELL (48). Afin de ne pas introduire de confusion avec la dénomination alpha₂ globulines lentes et rapides adoptées en électrophorèse sur gel d'amidon, nous avons choisi les termes d'alpha₂ A et alpha₂ B globulines, pour désigner respectivement les fractions rapide et lente que nous avons observées.

4° *Les Béta globulines*

Elles sont représentées par trois bandes successives. La plus rapide est bien colorée. Parfois elle s'orne d'un léger

feston dans sa limite lente. La bande intermédiaire est la plus importante tant par sa largeur que par l'intensité de sa coloration. La troisième fraction, la plus lente, est au contraire étroite; elle est beaucoup moins colorée que les deux précédentes. Nous n'avons pu établir de correspondance entre les bandes protéiques, que nous venons de décrire et d'autres sous-fractionnements connus des bêta globulines. L'électrophorèse utilisant un tampon borate permet en effet un tel sous-fractionnement des bêta globulines (ABEL-WAHAB (49) et CONSDEN (50)). Nous avons été tenté d'assimiler la fraction la plus lente aux bêta₂ globulines de l'électrophorèse en gélose (bêta₂ A globuline et bêta₂ macroglobuline de l'immuno-électrophorèse). Il n'en est rien. Le sang de cordon qui ne contient pas de bêta₂ globulines (SCHEIDEGGER et MARTIN DU PAN (51)), possède cependant cette fraction (voir page 37).

Ne voulant pas, d'autre part, distinguer ces trois bandes par les adjectifs « lent » ou « rapide » qui auraient laissé supposer un rapprochement possible avec les bêta lipoprotéines ou qui auraient pu faire confusion avec des termes utilisés en électrophorèse sur gel d'amidon pour des sous-fractions bien précises, nous avons été amené à adopter une nomenclature volontairement imprécise; c'est sous les termes 1°, 2° et 3° bêta globuline que nous avons désigné respectivement les fractions rapide, intermédiaire et lente.

5° *Les Gamma globulines*

La dernière bande, celle des gamma globulines, est large, régulière, homogène.

Fait important, on n'observe pas de « phénomène de traînée » entre le point de dépôt du sérum et la zone des gamma globulines. Il s'agit là d'un avantage supplémentaire à signaler à propos du tampon « T.E.B. ».

Au cours de cette description, nous avons envisagé le résultat du protéinogramme normal en tampon « T.E.B. »,

qu'il soit réalisé sur papier Schleicher et Schüll ou sur acétate de cellulose. Il existe cependant des différences suivant que l'on utilise l'un ou l'autre de ces supports. Avec le papier Schleicher et Schüll, le sous-fractionnement des

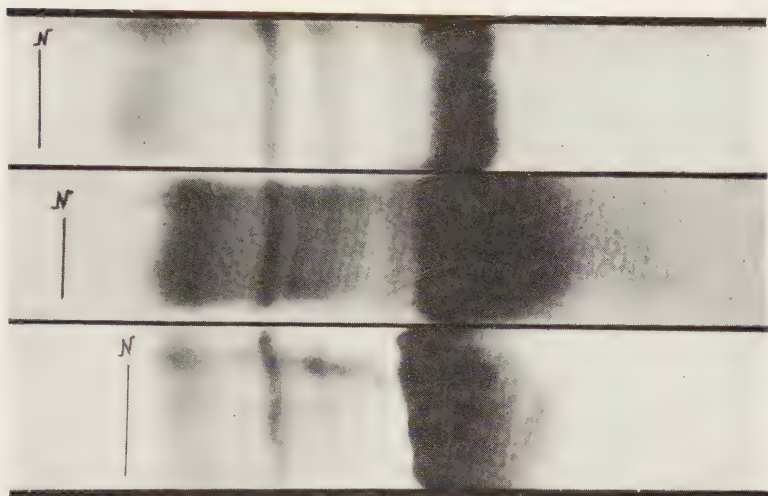


FIG. 1.

Protéinogrammes de sérums normaux.

En haut: Protéinogramme d'un sérum normal en tampon véronal, pH 8,9, sur papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl.

Au milieu: Protéinogramme d'un sérum normal en tampon « T.E.B. », pH 8,9, sur papier Schleicher et Schüll 2043 a Mgl.

En bas: Protéinogramme d'un sérum normal en tampon « T.E.B. », pH 8,9, sur acétate de cellulose.

Le trait transversal indique le lieu de dépôt du sérum. La sérum-albumine se trouve vers le pôle positif (à droite) et les gamma globulines vers le pôle négatif (à gauche). L'individualisation des 3^e bêta globulines est franche sur l'électrophorèse effectuée sur acétate de cellulose.

bêta globulines est parfois défectueux, la 3^e bêta globuline n'apparaissant pas dans certaines conditions. Au contraire, sur l'acétate de cellulose, ce sous-fractionnement est constant. En outre, on peut rencontrer deux fractions supplémentaires:

— d'une part la *préalbumine*, sous forme d'une petite zone légèrement colorée et située à quelque distance en avant de l'albumine (l'apparition de la *préalbumine* semble liée à la meilleure décoloration de fond que permet l'acétate de cellulose).

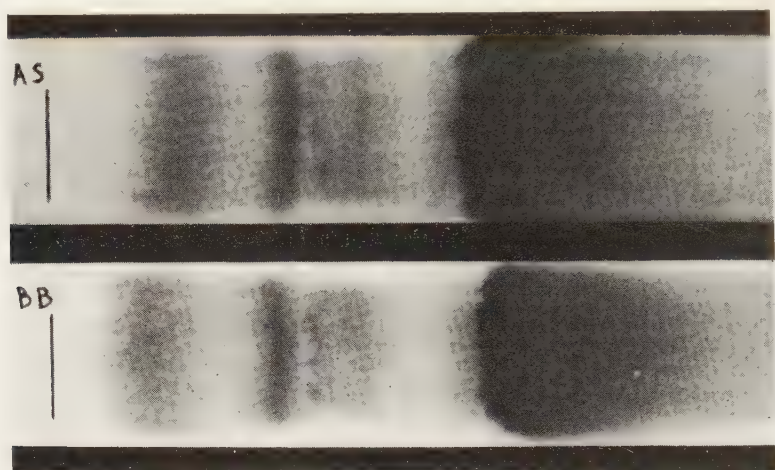


FIG. 2.

Protéiogrammes de sérums normaux en tampon « T.E.B. »
sur papier Schleicher et Schüll
et effectués dans les mêmes conditions.

En haut : coloration par l'Amidoschwarz (indiqué A.S.).

En bas : coloration par le Bleu de Bromophénol (indiqué B. B.).

La décoloration de fond du papier est meilleure avec le Bleu de Bromophénol ; par contre, les α_2 globulines y sont moins visibles. Les 1^o béta globulines s'ornent d'un léger feston sur les deux électrophorèses.

— d'autre part, une *deuxième* α_1 globuline, provenant d'un dédoublement de l' α_1 globuline habituelle.

Néanmoins, nous n'avons observé qu'exceptionnellement ces deux fractions que ARONSSON et GRÖNWALL (52) semblent obtenir de manière presque constante.

B — EVALUATION QUANTITATIVE

En possession d'une électrophorèse sur papier, il est tentant de la photométrer afin d'effectuer sur le diagramme obtenu une évaluation quantitative des diverses fractions protéiques. Deux types de décomposition du diagramme sont utilisables. L'une est de loin préférable: c'est la décomposition gaussienne. Mais elle nécessite deux conditions strictes qui ne sont pas réalisées en tampon « T.E.B. »: les sommets enregistrés doivent être symétriques (or, la Sérum-albumine, tout en restant homogène, est nettement asymétrique) et les échancrures séparant deux fractions doivent avoisiner la ligne de base (ce qui est loin de se produire pour les alpha et les bêta globulines dont le sous-fractionnement n'est souvent qu'ébauché sur les courbes, compte tenu des possibilités d'enregistrement dont nous disposons). Ces deux raisons nous amènent, à la suite de ARONSSON et GRÖNWALL, à retenir la décomposition par parallèles, tout en ne lui accordant qu'une signification limitée, et ce n'est qu'à titre purement indicatif et sans vouloir leur donner une valeur absolue, que nous donnons, ci-dessous, le pourcentage des différentes fractions d'un protéinogramme normal:

Sérumalbumine	56 p. 100
Alpha ₁ globulines	3 p. 100
Alpha ₂ A globulines	2,5 p. 100
Alpha ₂ B globulines	3,5 p. 100
1° bêta globulines	6 p. 100
2° bêta globulines	8 p. 100
3° bêta globulines	3 p. 100
Gamma globulines	18 p. 100

L'enregistrement du protéinogramme sur acétate de cellulose présenté sur la figure 4 a été effectué après imprégnation de la bande par de la décalkine, produit permettant d'obtenir avec l'acétate de cellulose de bien meilleurs résultats que l'huile de paraffine.

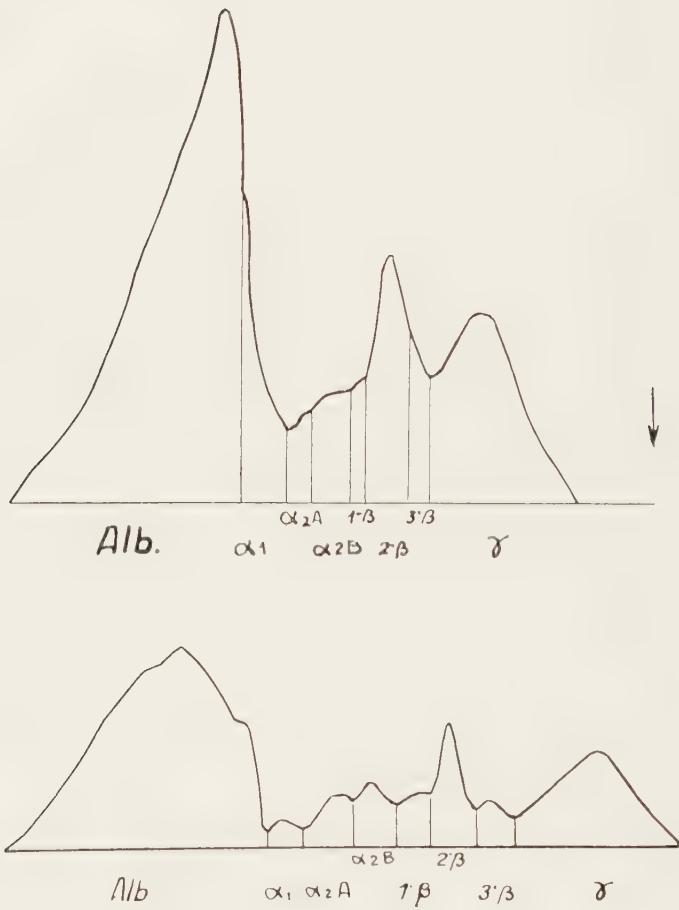


FIG. 3 et 4.

Enregistrements de protéinogrammes de sérums normaux effectués en tampon « T.E.B. ».

Enregistrement supérieur: électrophorèse sur papier Schleicher et Schüll.

Enregistrement inférieur: électrophorèse sur acétate de cellulose.

L'individualisation de la 3^e bêta globuline apparaît visiblement sur l'enregistrement du protéinogramme effectué sur acétate de cellulose.

Le lipoprotéinogramme du sérum normal

Les lipoprotéinogrammes que nous avons effectués n'ont pu l'être que sur papier Schleicher et Schüll, l'acétate de cellulose se colorant intensément et de manière irréversible par le Noir Soudan.

Le lipoprotéinogramme d'un sérum normal montre trois fractions, soudanophiles, qui sont dans l'ordre de leur mobilité décroissante (fig. 5):

— Une première bande homogène, bien limitée, de coloration grisâtre, peu intense mais parfaitement appréciable

— Une deuxième bande séparée de la précédente par un intervalle clair et de coloration comparable, sinon un peu plus foncée. Semblant en être échappée tel un prolongement, elle est soudée à:

— La troisième fraction colorée en noir, de beaucoup la plus importante. Celle-ci se termine, en outre, par une limite franche, sans le « phénomène de trainée » si habituel en tampon véronal. Un enregistrement photométrique montre à cet endroit une descente verticale, aboutissant presque à la ligne de base. C'est là, croyons-nous, l'un des avantages majeurs du lipoprotéinogramme en tampon « T.E.B. ».

Malheureusement, nous n'avons pu établir de manière tout à fait satisfaisante la correspondance entre les lipoprotéines et les diverses fractions protéiques du sérum (figure 6). La réalisation d'un lipoprotéinogramme nécessite en effet l'emploi de 40 microlitres de sérum, quantité trop importante qui supprime tout fractionnement des globulines alpha et béta sur le protéinogramme. Les seules relations que nous puissions affirmer avec certitude se résument ainsi : la fraction lipoprotéique la plus rapide correspond aux α_1 globulines et à la partie attenante de la sérum-albumine, la deuxième fraction s'étale à la fois sur les α_2 et les béta globulines, la troisième fraction, la plus lente, se superpose aux béta globulines.

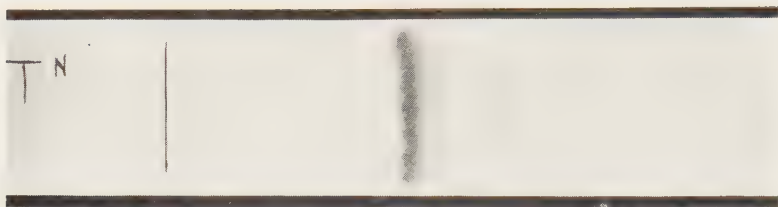


FIG. 5.

Lipoprotéinogramme d'un sérum normal en tampon « T.E.B. ».

Les α_1 lipoprotéines se trouvent vers le pôle positif (à droite) et les β lipoprotéines se trouvent vers le pôle négatif (à gauche).

Contrairement aux lipoprotéinogrammes effectués en tampon véronal, il n'existe pas de « phénomène de trainée » entre les β lipoprotéines et le lieu de dépôt du sérum sur les électrophorèses en tampon « T.E.B. ».

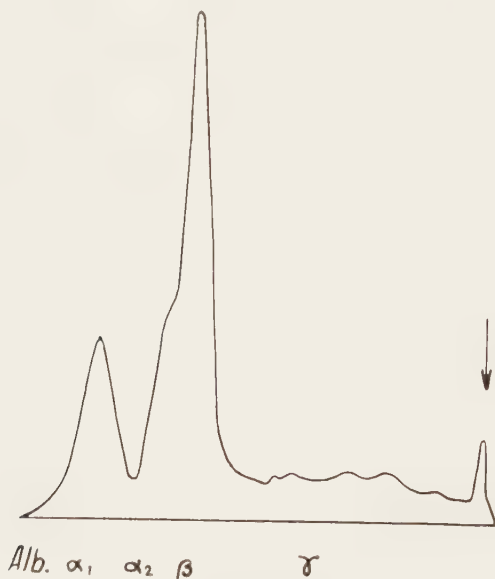


FIG. 6.

Enregistrement d'un lipoprotéinogramme normal
effectué en tampon « T.E.B. ».

Contrairement à la figure 5, les α_1 lipoprotéines se situent vers la gauche de la figure, alors que les β lipoprotéines se trouvent vers la droite.

Les indicatifs des différentes protéines (Sérum-albumine, α_1 globulines...) correspondent exactement aux emplacements de ces protéines sur le lipoprotéinogramme coloré secondairement par l'Amidoschwarz, donc transformé en protéinogramme.

Il semble cependant que la deuxième fraction soudanophile corresponde plus précisément à une zone englobant les α_2 B et 1° béta globulines, tandis que la troisième se situerait juste dans l'intervalle compris entre les 1° et 2° béta globulines. Ceci pouvant laisser supposer une répartition différente des zones soudanophiles et protéiques pures: là où existe un « vide protéique » (intervalle 1° - 2° béta globulines) peut se manifester un « clocher lipidique » (béta lipoprotéines).

Le glycoprotéinogramme du sérum normal

Les seuls glycoprotéinogrammes que nous ayons effectués en tampon « T.E.B. » l'ont été sur papier Schleicher et Schüll. Pour leur réalisation, nous avons rencontré les mêmes difficultés que pour celle des lipoprotéinogram-

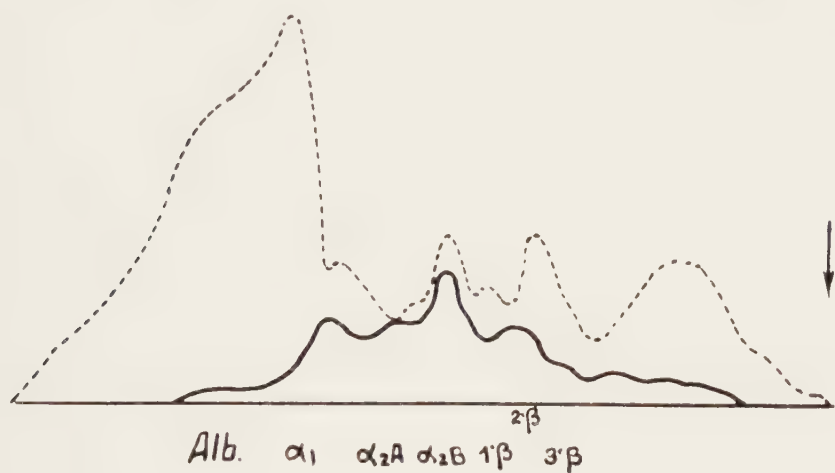


FIG. 7.

Enregistrements d'un glycoprotéinogramme (trait plein)
et d'un protéinogramme (trait pointillé) effectués en tampon « T.E.B. »
sur papier Schleicher et Schüll.

Les quantités de sérum utilisées sont de 30 microlitres pour le glycoprotéinogramme et 15 microlitres pour le protéinogramme.

mes: des quantités trop importantes de sérum, de l'ordre de 50 microlitres, nécessaires pour permettre la coloration nette des bandes, présentent néanmoins l'inconvénient de faire disparaître le sous-fractionnement des alpha et bêta globulines. Par ailleurs, des quantités de l'ordre de 20 microlitres de sérum sont insuffisantes pour que la coloration à l'acide périodique - réactif de Schiff permette un enregistrement. Aussi avons-nous déposé 30 microlitres de sérum pour réaliser l'électrophorèse qui nous a servi à l'enregistrement du glycoprotéinogramme que nous présentons, conjointement au protéinogramme, dans la figure 7.

L'examen de ce glycoprotéinogramme nous montre un certain nombre de fractions révélées par l'acide périodique - réactif de SCHIFF (P.A.S.).

La plus importante d'entre elles correspond sur le protéinogramme aux α_2 B globulines.

Deux autres bandes P.A.S. positives ont une migration plus rapide, dont l'une possède une mobilité d' α_1 globuline et dont l'autre est située au niveau des α_2 A globulines.

Enfin, une dernière fraction glycoprotéique, faiblement P.A.S. positive migre avec les bêta globulines.

Variations du protéinogramme en fonction de l'âge

Après l'étude du sérum de l'adulte sain, nous avons recherché quelles pouvaient être les variations du spectre protéique en fonction de l'âge. Pour cela, nous avons étudié ces variations pour chacune des catégories envisagées sur des pooling de cinq sérums, d'une part de nouveau-nés (sang de cordon), d'autre part de nourrissons âgés de 3 à 6 mois, enfin de vieillards. Les sujets examinés étaient exempts de tares pathologiques évidentes. Par rapport au « sérum adulte », nous avons remarqué un certain nombre de modifications que nous consignons dans le tableau II.

Indiquons, dès à présent, que nous avons adopté, pour les tableaux que nous présentons, les conventions suivantes :

Les augmentations d'une fraction protéique se notent de + à + + + +, leurs diminutions de — à — — — —, leur disparition par 0. Le signe = indique qu'elle n'a pas subi de modifications appréciables.

TABLEAU II

	Alb	α_1	α_2 A	α_2 B	1° β	2° β	3° β	Gamma globulines
Sang de cordon ..	=	++	-----	++	=	=	=	=
Nourrisson	=	=	--	+	=	=	=	--
Vieillard	=	=	++	—	=	=	=	=

Plusieurs détails sont dignes d'intérêt :

Les 3° béta globulines semblent en quantité normale chez le nouveau-né. Elles ne correspondent donc pas (au moins en totalité) aux β_{2A} globuline et β_{2M} globuline de l'immunoélectrophorèse. Par contre, la baisse des α_{2A} globulines chez le nourrisson et surtout chez le nouveau-né d'une part, et leur accentuation chez le vieillard, d'autre part, laisse supposer une teneur assez importante en glycoprotéines (dont l'haptoglobine et la céruléoplasmine).

CHAPITRE IV

POSSIBILITES DU TAMPON « T.E.B. » EN PATHOLOGIE

Nous avons eu l'occasion d'effectuer des électrophorèses en tampon « T.E.B. » de sérums pathologiques très divers, choisis le plus souvent parmi ceux dont le profil électrophorétique en tampon véronal était caractéristique d'affections déterminées. C'est ainsi que nous avons étudié les sérums de syndromes inflammatoires aigus, de néphroses lipoïdiques pures, de syndromes néphrotiques au cours d'autres maladies telles la néphrite-néphrose et l'amylose rénale, les sérums d'hyperlipémies essentielles, de diabète anciens et d'états précirrhotiques, de cirrhoses décompensées avec ou sans ascite, enfin les sérums de dysglobulinémies nettement caractérisées (Maladie de KÄHLER et Macroglobulinémie de WALDENSTRÖM).

Au cours de ces maladies, le profil électrophorétique en tampon « T.E.B. » a montré des ressemblances avec le profil électrophorétique en tampon véronal, mais l'intérêt que présente le tampon « T.E.B. » de sous-fractionner certaines globulines s'est révélé souvent très utile pour la compréhension de modifications protéiques d'origine différente, que les électrophorèses en tampon véronal ne laissaient même pas supposer.

Nous envisagerons les possibilités en pathologie du tampon « T.E.B. » en essayant de dégager, d'une part, en une étude analytique, les variations que peut subir chaque fraction prise isolément et, d'autre part, en une étude

synthétique, le profil électrophorétique particulier à quelques affections données.

Enfin, les dysprotéïnémies nettement caractérisées: Maladie de KAHLER et Macroglobulinémies de WALDENSTRÖM font l'objet d'un chapitre particulier.

Etude analytique

Pour plus de commodité, nous avons envisagé en premier lieu les variations de l'albumine et celles des gamma globulines, nous réservant de terminer par l'étude des variations des bêta globulines et alpha globulines, nettement plus intéressantes.

LES VARIATIONS DE LA SÉRUM-ALBUMINE

L'appréciation des variations quantitatives de la Sérum-albumine est grandement gênée par l'aspect asymétrique qu'elle présente en tampon « T.E.B. ». Aussi, l'intérêt de

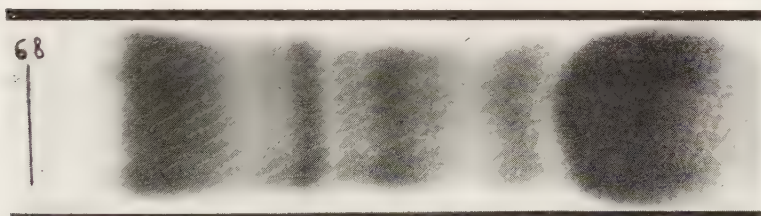


FIG. 8.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de Lupus érythémateux aigu disséminé.

La Sérum-albumine est abaissée et les gamma globulines sont augmentées.

son étude est-il réduit. Nous nous contenterons de signaler qu'elle présente des diminutions plus ou moins prononcées dans divers états pathologiques:

— au cours d'hyperglobulinémies α_1 et α_2 , accompagnées ou non d'une hyperglobulinémie gamma, dont

le type est le Rhumatisme Articulaire Aigu et les syndromes infectieux ou inflammatoires :

— au cours d'hyperglobulinémies gamma pures, telle la Périartérite noueuse et le Lupus érythémateux (figure 8).

— au cours des hyperglobulinémies gamma des cirrhoses ascitiques (figure 9),

— au cours d'hyperglobulinémies α_2 des néphroses (figure 9).

Quelle que soit l'importance de cette diminution de la Sérum-albumine, elle est toujours globale. Parfois, lorsqu'elle est très accusée, sa mobilité électrophorétique semble accélérée, vraisemblablement par suite d'une plus faible concentration protéique à son niveau.

LES VARIATIONS DES GAMMA GLOBULINES

En tampon véronal, les gamma globulines représentent les fractions gamma, β_2 , A et β_2 , M globulines de l'immuno-électrophorèse. Il y a tout lieu de supposer qu'en tampon « T.E.B. » il en est de même, car la pathologie des gamma globulines semble tout à fait superposable en tampon « T.E.B. » et en tampon véronal.

Nous avons noté des baisses de gamma globulines lors de néphroses et néphrites-néphroses (figure 12) ou au cours de la Maladie de KAHLER lorsque la migration de la protéine anormale permettait leur étude.

A l'opposé, des augmentations de gamma globulines ont été rencontrées, soit isolées — c'est le cas du Lupus érythémateux (figure 8), de la Périartérite noueuse —, soit accompagnées d'hyperglobulinémie alpha de type inflammatoire.

Néanmoins, celles qui sont les plus intéressantes s'observent au cours des Cirrhoses éthyliques décompensées (figures 9 et 10) alors que l'électrophorèse en tampon véronal montre une élévation des gamma globulines depuis les β_2 globulines, l'électrophorèse en tampon « T.E.B. » précise que cette augmentation débute depuis les 2° β_2 globulines,

mais laisse apparaître les 3° béta globulines en surimpression (si elle n'est pas trop importante pour les masquer).

Quels que soient les cas considérés, les élévations ou les diminutions portent sur l'ensemble de la fraction des gamma globulines. Pas davantage que pour les électrophorèses

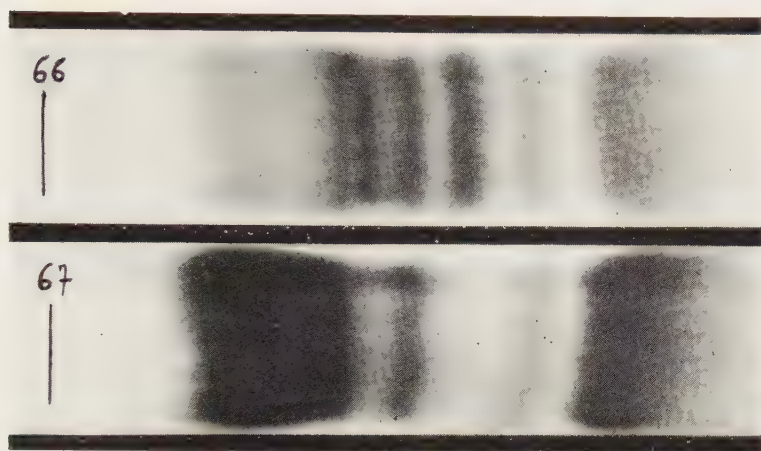


FIG. 9.

Protéinogrammes effectués sur papier Schleicher et Schüll.

En haut: sérum d'Amylose rénale.

En bas: sérum de Cirrhose éthylique ascitique.

Il existe une baisse de la Sérum-albumine dans les deux cas. Au contraire, les gamma globulines sont diminuées au cours de l'Amylose, alors qu'elles sont augmentées et s'étalent jusqu'aux 2° béta globulines au cours de la Cirrhose.

effectuées avec des solutions-tampons différentes, nous n'avons pu obtenir de fractionnements supplémentaires des gamma globulines. Le tampon « T.E.B. » permet seulement de préciser que l'étalement des gamma globulines au cours des Cirrhoses s'étend jusqu'aux 2° béta globulines.



FIG. 10.

Protéinogrammes sur acétate de cellulose.

En haut: sérum normal témoin.

En bas: sérum de Cirrhose éthylique sans ascite (sérum différent de celui représenté sur la figure 9).

Sur le protéinogramme du sérum de Cirrhose, malgré leur étalement jusqu'aux 2° bêta globulines, les gamma globulines laissent apparaître les 3° bêta globulines.

LES VARIATIONS DES BÉTA GLOBULINES

Les variations des béta globulines en tampon véronal se rattachent surtout à la pathologie des lipides et des lipoprotéines, qu'il s'agisse d'hyperlipémie essentielle ou d'hyperlipémie secondaire. Une corrélation identique se retrouve en tampon « T.E.B. ». Mais il surgit une difficulté que nous avons déjà rencontrée: une augmentation trop importante des lipoprotéines supprime le fractionnement des béta globulines et il devient délicat de vouloir attribuer à telle fraction plutôt qu'à telle autre, l'origine des modifications observées.

Le tampon « T.E.B. » présente, en outre, un avantage sur le tampon véronal: il explore une fraction protéique supplémentaire, les 3° béta globulines qui ne semblent pas intéressées par les troubles lipidiques. Malheureusement, l'inconstance de cette fraction sur papier Schleicher et Schüll ne nous a pas toujours permis de suivre ses variations.

Dans un souci de clarté, nous avons cru bon de grouper dans le tableau III, les diverses modifications pathologiques observées au niveau des béta globulines du sérum.

TABLEAU III

	alpha ₂ B	1° β glob.	2° β glob.	3° β glob.	Gamma globulines
Néphrose pure	++++ ↔	+++++	—	—	—
Néphrite-Néphrose		++++	—	—	—
Amylose rénale		+++	—	=	
Diabète ancien		++	←	?	
Cirrhose ascitique		—	? ↔	?	↔
Cirrhose non ascitique ..		—	— ↔	+	↔
Maladie de HODGKIN ...		+	=	++	
Périartérite noueuse		—	=	++	
Hyperlipémie essentielle ..		+	↔	+	↔

Les flèches réunissant deux fractions protéiques indiquent que celles-ci ne sont pas dissociées l'une de l'autre.

L'examen de ce tableau nous permet de tirer les conclusions suivantes :

— Au cours des hyperlipémies essentielles (nous avons eu l'occasion de répéter nos expériences sur deux cas différents), le tampon « T.E.B. » ne nous a pas fourni de renseignements supplémentaires par rapport au tampon véronal, les bêta globulines se séparent mal les unes des autres (au moins en papier Schleicher et Schüll : nous regrettons de n'avoir pu expérimenter ces cas sur acétate de cellulose).

— Au cours des hyperlipémies secondaires telles : la néphrose lipoïdique pure ou néphropathie œdémateuse de l'enfant (figure 11), la néphrite-néphrose (figure 12), l'amylose rénale (figure 9), le diabète ancien avec atteinte vasculaire (figure 13), nous avons observé une baisse à peu près constante des 2° et 3° bêta globulines et une augmentation des 1° bêta globulines, modifications proportionnelles à l'hyperlipémie, semble-t-il.

— Au cours des cirrhoses éthyliques décompensées : les 1° bêta globulines sont basses. Le taux plus ou moins élevé des gamma globulines ne nous a pas permis de nous faire une idée précise des modifications des 2° et 3° bêta globulines.

— Au cours des cirrhoses, avec ou sans ascite, les 1° bêta globulines sont basses, ce qui est vraisemblablement en rapport avec une diminution de la lipémie, alors que la maladie de HODGKIN et la Périartérite noueuse (figure 14) s'accompagnent plus volontiers d'une augmentation des 3° bêta globulines (concomitante à une hypergamma globulinémie).

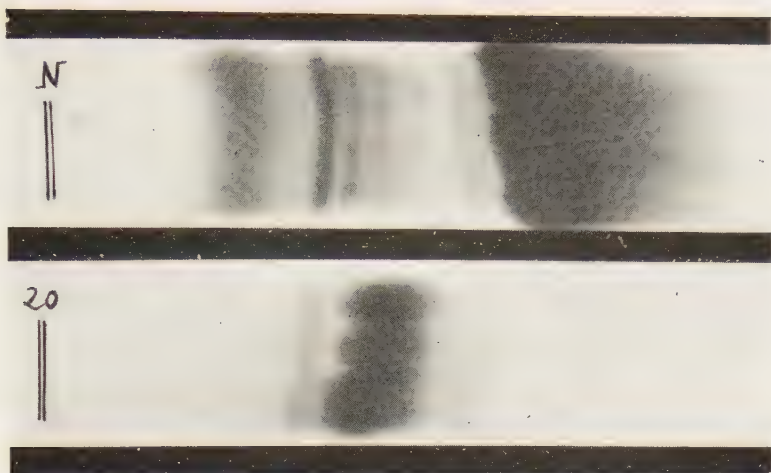


FIG. 11

Protéinogrammes sur papier Schleicher et Schüll.

En haut: sérum normal témoin.

En bas: sérum de Néphrose lipoidique pure (Néphropathie œdémateuse chez un enfant).

Sur le protéinogramme du sérum de Néphrose, les α_2 globulines (vraisemblablement fraction α_2 , B globuline, la fraction α_1 , A globuline n'étant pas visible parce que trop faible) sont fusionnées aux 1^o β globulines et l'ensemble forme une seule bande protéique.



FIG. 12.

Protéinogrammes sur acétate de cellulose.

En haut: sérum normal témoin.

En bas: sérum de Néphrite-néphrose.

Sur le protéinogramme pathologique, au niveau des β globulines, il existe une augmentation des 1^o β globulines, alors que les 2^o et 3^o β globulines sont abaissées.

En outre, les α_2 B globulines sont élevées; la Sérum-albumine (dont la migration est accélérée) et les gamma globulines sont diminuées.

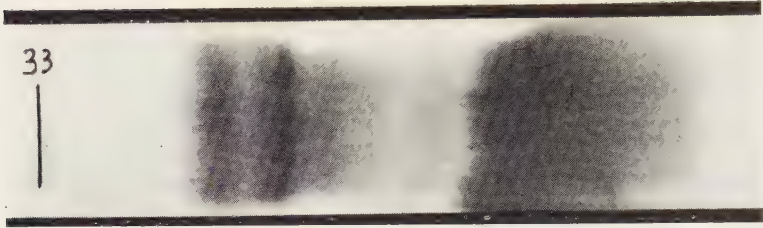


FIG. 13.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de diabète ancien avec athérosclérose.

Les 1° bêta globulines qui sont augmentées, sont caractérisées par un feston dans leur portion lente.

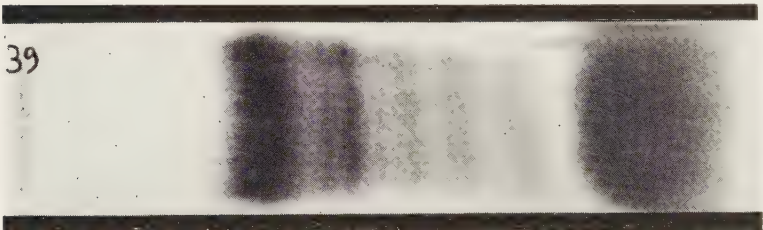


FIG. 14.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de Périartérite noueuse.

Les 3° bêta et les gamma globulines sont augmentées, les 1° bêta globulines et la Sérum-albumine sont diminuées.

LES VARIATIONS DES ALPHA GLOBULINES

Les alpha globulines, colorées par l'acide périodique-réactif de SCHIFF, sont tout particulièrement riches en fractions glycoprotéiques: orosomucoïde en α_1 , haptoglobine, céruléoplasmine, α_2 macroglobuline pour les α_2 globulines. Aussi est-il logique de s'attendre à retrouver dans les modifications des alpha globulines une grande partie de la pathologie des glycoprotéines. Le tampon « T.E.B. » apporte cependant un intérêt qui lui est particulier; en fractionnant les α_2 globulines en deux groupes: les α_2 A et α_2 B globulines, il permet une classification des hyperalpha-globulinémies, ce qui n'était pas réalisable en tampon véronal.

Nous avons groupé les variations pathologiques portant tour à tour sur les α_1 , les α_2 A et α_2 B globulines et nous avons schématisé nos résultats dans le Tableau IV:

TABLEAU IV

	α_1 glob.	α_2 A glob.	α_2 B glob.
	—	—	—
Cirrhose	=	----	=
Maladie de WILSON	=	----	+++
Angine	+	++	=
R.A.A.	+++	++++	+
Maladie de HODGKIN	++++	+++++	++
Pleurésie	++	++	++
Médiastinite	++++	++++ $\longleftrightarrow$	++
Amylose rénale	=	+++	+++
Néphrite-Néphrose	=	++	++++
Néphrose pure	—	----	+++++

De l'étude de ce tableau, il résulte que les augmentations concomitantes des α_2 A et α_2 B globulines, qui s'ac-

compagnent parfois de leur fusion, pouvant se voir aussi bien dans des syndromes néphrotiques compliqués: néphrite-néphrose (figures 12 et 17), amylose rénale (figure 18) et dans les états infectieux sévères: médiastinite suppurée (figure 16).

Au contraire, l'augmentation des α_2 B globulines (sans modification des α_2 A globulines) sont plutôt l'apanage des néphroses pures et l'augmentation des α_2 A (sans modification des α_2 B globulines), se rencontrent dans les états inflammatoires, tels le rhumatisme articulaire aigu et l'angine fébrile (figures 15 et 15 bis).

Ces constatations sont à rapprocher des résultats que ARONSSON, GRÖNWALL et LAUSING (53) rapportent à propos d'électrophorèses en tampon « T.E.B. » effectuées chez des malades atteints de tuberculose pure (augmentation des α_2 A globulines) et de tuberculose compliquée d'amylose (augmentation prédominante des α_2 B globulines).

Il s'agit là d'un des avantages essentiels de l'électrophorèse pratiquée en tampon « T.E.B. » par rapport à l'électrophorèse sur papier en tampon véronal: la dissociation des hyperalpha₃ globulinémies. Une telle dissociation est déjà mise en évidence par l'immunoélectrophorèse. On sait, en effet, que cette technique montre, au cours de la néphrose lipoïdique pure, un arc des α_2 macroglobulines particulièrement bien dessiné, en crochet, et qui est responsable de l'augmentation des α_2 globulines à l'électrophorèse sur papier. Au contraire, au cours du rhumatisme articulaire aigu, l'immuno-électrophorèse révèle un arc de l' α_2 macroglobuline peu net, mais des arcs extrêmement francs au niveau des autres α_2 globulines, en particulier celui de l'haptoglobine.

Il est donc vraisemblable qu'une des composantes des α_2 B globulines en tampon « T.E.B. » soit l' α_2 macroglobuline, alors que les α_2 A globulines contiendraient diverses autres glycoprotéines dont l'haptoglobine.

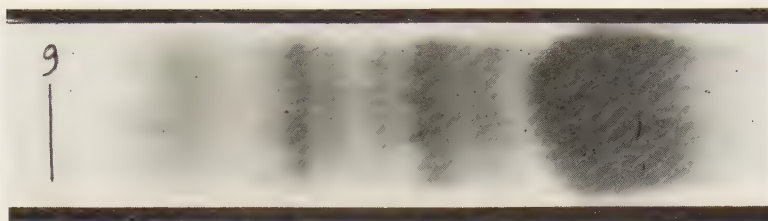


FIG. 15.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de Rhumatisme articulaire aigu.

Les alpha₂ A globulines sont franchement augmentées.

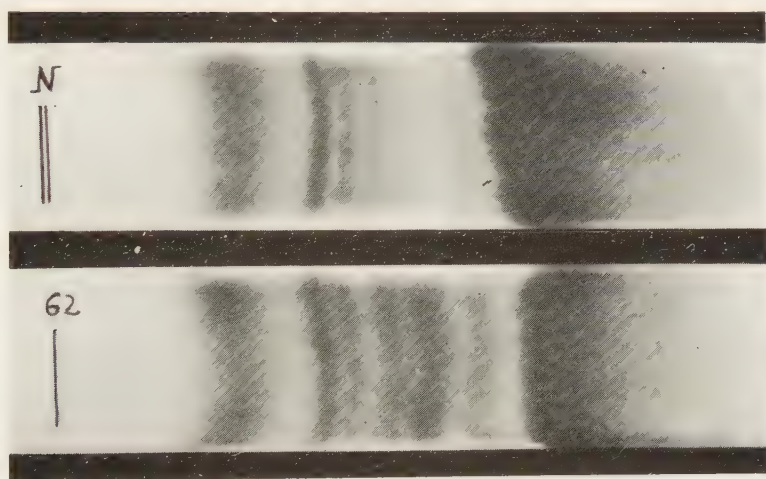


FIG. 15 bis.

Protéinogrammes sur papier Schleicher et Schüll.

En haut: sérum témoin normal.

En bas: sérum d'angine fébrile.

Les alpha₂ A globulines sont franchement augmentées.

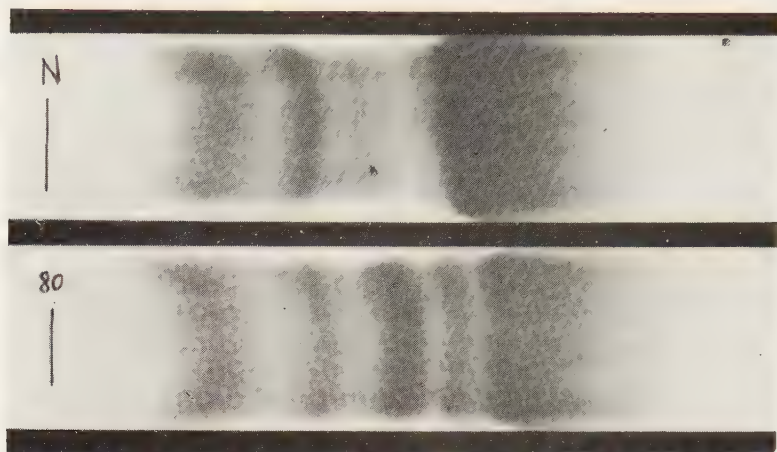


FIG. 16.

Protéinogrammes sur papier Schleicher et Schüll.

En haut: sérum normal témoin.

En bas: sérum d'un cas de suppuration médiastinale (par rupture de l'œsophage).

Au niveau du protéinogramme pathologique, il existe une augmentation concomitante des α_1 , A et α_1 , B globulines.

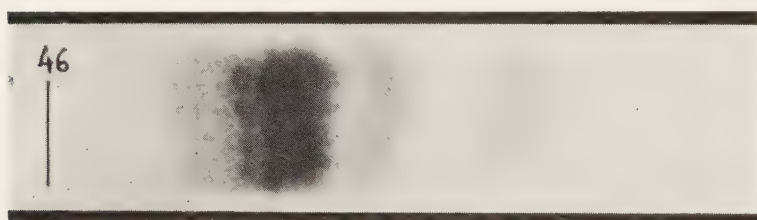


FIG. 17.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de Néphropathie œdémateuse (s'accompagnant de Néphrite)
chez un enfant.

Les deux fractions intensément colorées correspondent aux α_1 , A et α_1 , B globulines. Les 1° β globulines sont également augmentées, mais de façon relativement moindre. La Sérum-albumine et les gamma globulines sont par contre très diminuées.

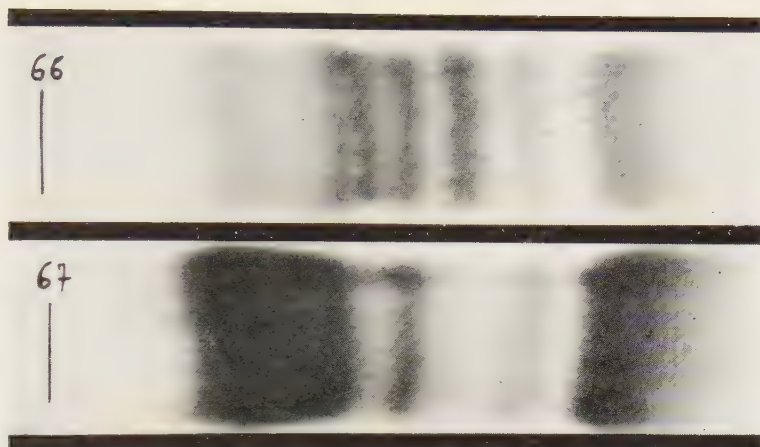


FIG. 18.

Protéinogrammes sur papier Schleicher et Schüll.

En haut: sérum d'Amylose rénale.

En bas: sérum de Cirrhose éthylique avec ascite.

Au cours de l'Amylose, il existe une augmentation des α_2 et α_1 globulines. Au cours de la cirrhose, les α_2 globulines sont extrêmement basses et par suite difficilement visibles.

Un autre intérêt de l'électrophorèse en tampon « T.E.B. », conséquence du sous-fractionnement des α_2 globulines, réside dans le fait qu'elle permet de révéler la quasi disparition de certaines fractions: Ainsi, dans la maladie de WILSON, la fraction α_2 globuline est très abaissée, sinon totalement disparue, ce qui est à rapprocher de l'absence de céruléoplasmine dans ce syndrome.

Etude synthétique

Ayant envisagé dans l'étude analytique qui précède, les variations pathologiques des diverses fractions protéiques, prises isolément, nous voudrions, maintenant, en une étude synthétique, montrer le diagramme complet que donnent en électrophorèse en tampon « T.E.B. » certains sérums pathologiques. Aussi présentons-nous, ci-dessous, quelques observations cliniques de malades pour lesquels ont été effectuées, outre les électrophorèses classiques en véronal, des électrophorèses en tampon « T.E.B. » et les immunoélectrophorèses.

Bien que de nombreux profils électrophorétiques en tampon « T.E.B. » soient caractéristiques d'affections déterminées, nous n'en avons retenu que trois parce qu'ils sont particulièrement typiques et parce qu'ils traduisent des modifications protéiques absolument différentes et sans correspondance les unes avec les autres.

Ces trois profils électrophorétiques correspondent à un cas de Néphrose lipoïdique pure, à un cas de Cirrhose éthylique et à un cas de Rhumatisme articulaire aigu.

Afin que l'électrophorèse en tampon « T.E.B. » puisse être replacée dans le cadre clinique et biologique de l'affection correspondante, nous avons tenu à présenter l'observation complète de chacun des malades, et à décrire simultanément les modifications éventuelles de l'immunoélectrophorèse.

OBSERVATION N° 1

Néphrose lipoïdique pure ou Néphropathie œdémateuse.

Il s'agit d'un garçon âgé de 9 ans dont la santé semble satisfaisante jusqu'en 1956, date à laquelle les premiers signes de sa maladie apparaissent et nécessitent son hospitalisation à trois reprises. C'est au cours de son quatrième séjour hospitalier (Clinique Médicale Infantile, Professeur NEIMANN) que nous sommes amené à voir cet enfant.

Du point de vue clinique, l'enfant est pâle, présente un œdème généralisé, prédominant au niveau du visage où il gonfle les pau-

pières et au niveau des membres inférieurs. Il existe une ascite peu abondante.

L'examen clinique est, par ailleurs, normal. La tension artérielle est à 12/8.

Le bilan biologique est le suivant :

Numération globulaire	3 700 000	Globules rouges
Urée sanguine	0,10	g/l
Protides sanguins	50	g/l
Cholestérol sanguin	4,15	g/l
Lipides sanguins	16,5	g/l
Culot des urines	albuminurie à 1,90 g/l avec présence de corps biréfringents.	

L'électrophorèse en tampon véronal montre, d'une part, une baisse considérable de la sérum-albumine et des gamma globulines, et d'autre part, des α_2 globulines très augmentées.

L'électrophorèse sur papier Schleicher et Schüll en tampon « T.E.B. » révèle (figure 19), une répartition protéique semblable : la sérumalbumine et les gamma globulines sont très diminuées, ainsi que les 2° et 3° béta globulines.

Les α_2 A globulines ne sont pas visibles. Vraisemblablement, leur taux extrêmement faible ne permet pas leur révélation par l'Amidoschwarz.

Quant aux α_2 B et 1° béta globulines, elles sont considérablement augmentées, ne sont pas dissociées l'une de l'autre et sont confondues en une seule bande sur l'électrophorégramme.

Cette fraction se retrouve, d'ailleurs, sur le lipoprotéinogramme en tampon « T.E.B. » où elle constitue une large bande soudanophile, intensément colorée.

L'immunoélectrophorèse que nous avons effectuée, révèle, à côté d'une atténuation des arcs de la Sérum-albumine, des gamma globulines et de la β_2 A globuline, un épaissement et un renforcement des arcs des lipoprotéines α_2 et de l' α_2 macroglobuline (figure 19).

Ainsi, il est possible de retrouver dans l'électrophorèse en tampon « T.E.B. » les modifications biologiques mises en évidence par d'autres méthodes : à l'hypercholestérolémie et à l'hyperlipémie correspond une hyperlipoprotéïnémie et une hyper α_2 B - 1° béta globulinémie ; l'immunoélectrophorèse précise que le trouble protéique se situe au niveau des alpha lipoprotéines et de l' α_2 macroglobuline.

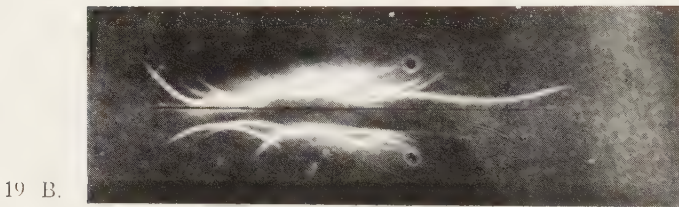
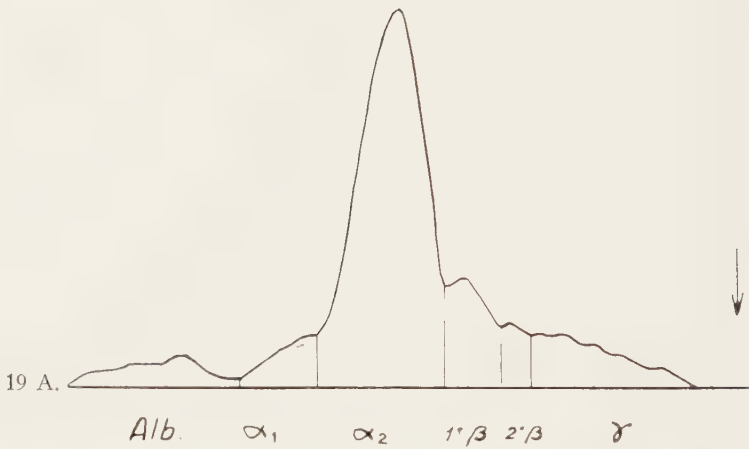


FIG. 19.

Electrophorèses du sérum de Néphropathie œdémateuse.

19 A. Enregistrement du protéinogramme obtenu par électrophorèse sur papier en tampon « T.E.B. ».

19 B. Immunoélectrophorèses

— En haut: sérum normal.

— En bas: sérum pathologique.

Au niveau du sérum pathologique, l'arc de l' α_2 Macroglobuline est franchement dessiné et possède un aspect « en crochet ». Au contraire, l'arc des gamma globulines est très estompé.

OBSERVATION N° 2

Cirrhose éthylique ascitique.

Il s'agit d'un adulte de 56 ans, n'ayant aucun antécédent pathologique notable. Sa maladie a commencé il y a deux mois par l'apparition d'une ascite abondante. Son médecin traitant essaie, d'abord, de le soigner à domicile par plusieurs ponctions de liquide d'ascite, mais devant l'aggravation de l'état général de son patient, il juge plus utile de le faire hospitaliser (Clinique médicale A, Professeur MICHON).

L'état général du malade qui a maigri de 12 kg en l'espace de 3 mois est médiocre ; son teint est subictérique. L'examen clinique découvre une ascite très abondante, s'accompagnant d'un signe du flot et d'un déplissement de l'ombilic. Une importante circulation collatérale marbre la paroi abdominale. Existente, en outre, des troubles neurologiques au niveau des membres inférieurs avec exagération des réflexes ostéotendineux et douleur à la pression des masses musculaires des jambes.

Ce malade n'a jamais présenté d'hémorragie digestive.

Son bilan biologique est le suivant :

Numération globulaire	3 750 000 Globules rouges
Urée sanguine	0,25 g/l ✓
Cholestérol sanguin	1,29 g/l
Lipides sanguins	3,20 g/l
Test de labilité colloïdale :	Test de GROS 1,9 cc (Normal 2 à 3 cc)
	Test de MAC-LAGAN 18 (Normal 0 à 20)
	Test de HANGER 60 (Normal 0 à 12)
Protides sanguins	68 g/l
Taux de Prothrombine	40 pour 100.

L'électrophorèse en tampon véronal montre une baisse importante de la Sérum-albumine, plus modérée des α_2 globulines. Par contre, les bêta et gamma globulines sont augmentées avec une fusion de leurs deux sommets sur la courbe d'enregistrement.

L'électrophorèse en tampon « T.E.B. » révèle des perturbations protéiques similaires, mais précise certaines d'entre elles (figure 20).

— La baisse de la Sérum-albumine et des α_2 A globulines est manifeste.

— Au contraire, les gamma globulines, considérablement aug-

mentées, englobent dans leur bande protéique les 3^o bêta globulines.

Sur l'immunoélectrophorèse, les arcs de précipitation des gamma globulines, de la bêta₂ A et de la bêta₂ M globulines sont particulièrement épaissis. Au contraire, les arcs de la Sérum-albumine et de certaines alpha₂ globulines sont moins marqués que normalement (figure 20).

Le déséquilibre protéique que laisse soupçonner les perturbations mises en évidence par les tests de labilité colloïdale se retrouvent au niveau des diverses électrophorèses pratiquées. La baisse du taux de la Sérum-albumine et des alpha₂ globulines est compensée par une augmentation relative du taux des bêta et gamma globulines. L'intérêt du tampon « T.E.B. » est assez limité: pourtant il précise que la baisse des alpha globulines porte sur la fraction alpha₂ A (tandis que l'alpha₂ B globuline est normale, peut-être même accentuée) et que l'étalement des gamma globulines s'étend jusqu'aux 2^o bêta globulines.

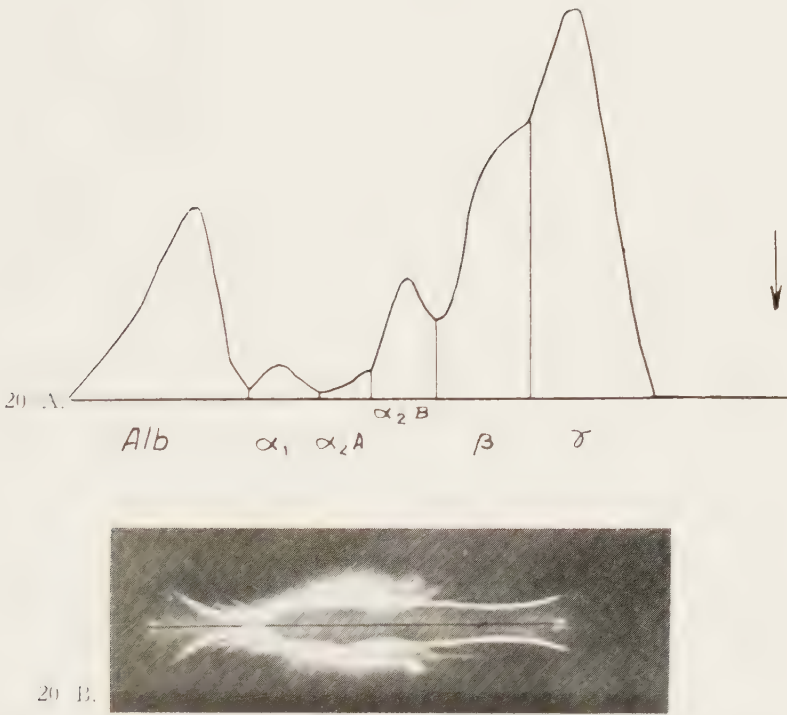


FIG. 20.

Electrophorèse du sérum de Cirrhose éthylique.

20 A: Enregistrement du protéinogramme obtenu par électrophorèse sur papier en tampon « T.E.B. ».

20 B: Immunoélectrophorèses

— En haut: sérum normal.

— En bas: sérum pathologique.

Au niveau du sérum pathologique, l'arc des gamma globulines de la β_2 et de la β_1 globulines sont bien dessinés et légèrement épaissis.

OBSERVATION N° 3

Rhumatisme articulaire aigu.

Il s'agit d'une jeune malade de 19 ans ayant déjà présenté en 1950 une première atteinte de Rhumatisme articulaire aigu. Depuis, sa santé a été excellente. Son histoire actuelle débute quinze jours auparavant par une angine s'accompagnant de fièvre (39° C), de dysphagie et d'adénopathies sous-maxillaires. Tout semble rentrer dans l'ordre après quelques jours, mais depuis une semaine la température remonte, des douleurs articulaires apparaissent. C'est à ce moment que nous voyons cette malade (Clinique Médicale A, Professeur MICHON). Sa température est à 38,8° C, elle se plaint de gonflements douloureux de l'articulation tibio-tarsienne gauche et des deux poignets, mais récemment encore, c'étaient ses genoux et un coude qui la faisaient souffrir. Outre les manifestations articulaires, l'examen clinique révèle la présence d'un souffle cardiaque systolique peu intense, siégeant au niveau de la pointe, sans irradiation franche, et sur la nature duquel il est difficile de se prononcer : est-ce un souffle anorganique ou est-ce le témoin d'une atteinte valvulaire antérieure à type d'insuffisance mitrale ? L'électrocardiogramme est normal. La T.A. est à 12/7.

Le bilan biologique est le suivant :

Numération globulaire :

4 160 000 Globules rouges.

8 500 Globules blancs, dont :

70 pour 100 de polynucléaires neutrophiles,

1 pour 100 de polynucléaires éosinophiles,

23 pour 100 de lymphocytes,

6 pour 100 de monocytes.

Vitesse de sédimentation : 80 mm/115 mm, respectivement à la 1^{re} et à la 2^e heure.

Antistreptolysines : 50 Unités à l'entrée au Service, 200 Unités 10 jours après.

Prélèvement de gorge : absence de streptocoques hémolytiques

Fibrine plasmatique : 7 g/litre.

Protéine C Réactive : réaction positive.

Réaction de WAALER-ROSE : négative.

L'électrophorèse sur papier en tampon véronal montre une augmentation franche des alpha globulines et une accentuation des gamma globulines. Par contre, la Sérum-albumine est diminuée.

L'électrophorèse en tampon « T.E.B. » (figure 21) révèle de sem-

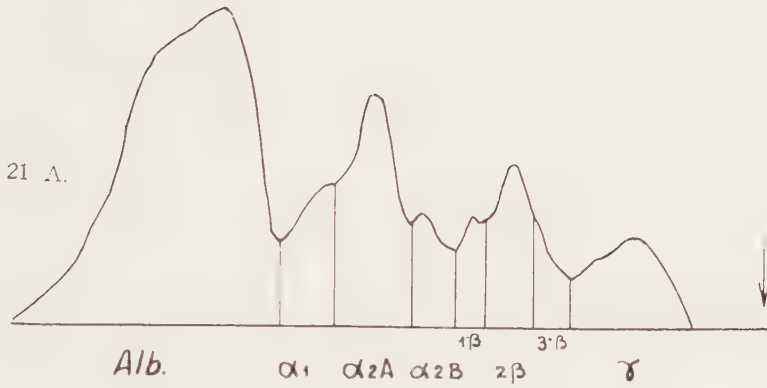


FIG. 21.

Electrophorèse du sérum de Rhumatisme articulaire aigu.

21 A : Enregistrement du protéinogramme obtenu par électrophorèse sur papier en tampon « T.E.B. ».

21 B : Immunoélectrophorèses :

— En haut : sérum normal.

— En bas : sérum pathologique.

Au niveau du sérum pathologique, l'arc de l'haptoglobine est particulièrement franc et légèrement agrandi dans le sens de la longueur.

blables anomalies au niveau de la Sérum-albumine et des gamma globulines. Elle a le mérite de préciser que l'augmentation des α_2 globulines décelées en tampon véronal porte uniquement, en réalité, sur les α_2 A globulines.

L'immuno-électrophorèse montre des arcs de précipitation agrandis et bien dessinés au niveau des α_2 globulines, en particulier en ce qui concerne l'arc correspondant à l'haptoglobine (figure 21).

Ainsi l'électrophorèse en tampon « T.E.B. » a le mérite de rapporter à une sous-fraction bien déterminée (les α_2 A globulines) l'essentiel des troubles protéiques rencontrés au cours du Rhumatisme articulaire aigu dont on sait, par ailleurs, qu'ils portent sur certaines α_2 globulines dont l'haptoglobine.

Ces trois observations nous permettent de retenir l'intérêt que présentent les électrophorèses en tampon « T.E.B. » dans le domaine de la pathologie. D'une part, nous avons eu l'occasion de constater la quasi disparition de certaines sous-fractions (α_2 A globulines au cours de la Néphrose lipoïdique et au cours de la Cirrhose ascitique), ce que ne peut permettre l'électrophorèse en tampon véronal — ces sous-fractions étant confondues en une seule bande protéique. D'autre part, les hyper α_2 globulinémies peuvent être dissociées par l'électrophorèse en tampon « T.E.B. », suivant que les troubles protéiques portent sur les α_2 A globulines (cas du Rhumatisme articulaire aigu) ou sur les α_2 B globulines (cas de la Néphrose lipoïdique pure), en deux catégories: les hyper α_2 globulinémies d'origine inflammatoire et les hyper α_2 globulinémies de type néphrotique.

Dysglobulinémies et électrophorèse en tampon « T.E.B. »

Sous le terme de dysglobulinémie, nous avons réuni la maladie de KAHLER et les macroglobulinémies de WALDENSTRÖM, c'est-à-dire les affections pouvant comporter à l'électrophorèse la présence d'une fraction protéique anormale, se situant dans une zone limitée allant des bêta globulines au gamma globulines lentes. Il n'y a guère de

diagnostic différentiel à établir entre une dysglobulinémie et certaines affections comportant de profondes modifications globuliniques: les hypergammaglobulinémies isolées (type Kala Azar), — et à plus fortes raisons les hypergammaglobulinémies des cirrhoses (qui s'étalent jusqu'aux bêta globulines) — sont trop globales pour être confondues avec l'assise toujours étroite d'une dysglobuline dont le caractère essentiel est de se surajouter au diagramme protéique habituel.

Néanmoins, si l'électrophorèse en véronal permet de reconnaître facilement la présence d'une dysglobuline dans un sérum (à condition encore que ce dernier en contienne suffisamment: certaines maladies de KAHLER authentiques possèdent une électrophorèse normale), elle ne permet pas de faire la distinction entre la maladie de KAHLER et les macroglobulinémies de WALDENSTRÖM. Pour cela, il faut avoir recours au contexte clinique et à la cytologie.

Toutefois, l'immuno-électrophorèse se révèle intéressante parce qu'elle délimite le siège de l'anomalie protéique: au niveau des gamma ou de la bêta₂ A globuline en cas de maladie de KAHLER, au niveau de la bêta₂ M globuline au cours des macroglobulinémies de WALDENSTRÖM (figure 26).

L'électrophorèse en tampon « T.E.B. » permet-elle une dissociation entre ces deux affections?

Au cours de ce travail portant sur l'application à la pathologie de ce tampon « T.E.B. », nous avons eu l'occasion d'étudier trois cas de maladie de WALDENSTRÖM (Macroglobulinémie pure sans néoplasie associée) et cinq cas de maladie de KAHLER.

Dans le tableau V, nous donnons la position de la protéine pathologique de ces différents cas par rapport aux autres fractions protéiques. Lorsqu'une immuno-électrophorèse a été réalisée, nous donnons la nature de l'atypie mise en évidence:

TABLEAU V

Cas envisagés	Gammaglobulines		Immuno- électrophorèse
	rapides	lentes	
M. de KAHLER			
N° 29	+++++		béta, A globuline
N° 42		+ + + + +	
N° 126		+++++	gamma globuline
N° 131		+ + + + +	
N° 21	(++)	(+++)	gamma globuline
M. de WALDENSTRÖM			
N° 5		+++++	béta, M globuline
N° 27		+++++	
N° 50		+++++	

Un fait se dégage: ce n'est pas sur la mobilité de la protéine pathologique, située le plus souvent au niveau des gamma globulines, que l'on pourra différencier Myélome et Macroglobulinémies. Ce n'est pas, non plus, sur l'aspect de la dysglobuline que l'on pourra espérer faire une telle distinction; elle se présente, en effet, à peu près toujours de la même manière: intensément colorée, avec des limites nettes, volontiers festonnée et dentelée à sa partie la plus lente. Lorsqu'elle est très abondante, elle semble entraver la migration des autres protéines (figures 22 et 23) dont les différentes fractions sont mal séparées les unes des autres.

Il en résulte que l'électrophorèse en tampon « T.E.B. », pas plus que l'électrophorèse en tampon véronal, n'est une méthode permettant de trancher un diagnostic entre maladie de KÄHLER et macroglobulinémie de WALDENSTRÖM, ce qui est par contre possible grâce à l'immunoélectrophorèse.

Nous voudrions, cependant, signaler un cas qui nous a paru digne d'intérêt: c'est celui d'une maladie de KÄHLER (N° 21 de notre tableau) dont le tracé électrophorétique en tampon véronal montrait la présence d'une globuline aty-

pique, homogène de localisation gamma, dont l'immuno-électrophorèse précisait la nature « anormale » de cette globuline par la formation d'un arc supplémentaire se raccordant à celui des gamma globulines. En outre, il existait une albuminurie de BENCE-JONES caractérisée à l'électrophorèse en tampon véronal par la présence d'une globuline homogène de migration bêta, mais ne donnant pas d'arc de précipitation à l'immunoélectrophorèse (immun-sérum utilisé: SAHN n° 491 de l'Institut Pasteur). Nous avons eu la surprise de constater que l'électrophorèse de ce sérum en tampon « T.E.B. » montrait un dédoublement de la fraction atypique (figure 24). Un tel dédoublement s'est retrouvé au niveau de la protéine de BENCE-JONES lors d'une électrophorèse urinaire en tampon « T.E.B. ». A notre connaissance, c'est le seul cas de sous-fractionnement obtenu par électrophorèse d'une globuline myélomateuse et d'une protéine de BENCE-JONES. Cette découverte fortuite ne nous autorise cependant pas à en tirer de conclusions, bien que nous ayons rencontré un second cas de dédoublement d'une protéine de BENCE-JONES au cours d'une autre maladie de KAHLER, sans qu'il y ait cette fois de dédoublement de la globuline sérique anormale. En effet, trois autres cas de protéinuries de BENCE-JONES comportaient une fraction homogène tant à l'électrophorèse en tampon « T.E.B. » qu'à l'électrophorèse en tampon véronal.

Nous voudrions enfin signaler à propos de ces sérums myélomateux, un fait particulièrement troublant: il s'agit de huit sérums dont l'immunoélectrophorèse met en évidence de façon non douteuse, un arc de « type myélomateux » au niveau des gamma globulines ou de la bêta₂ A globuline, sans qu'il s'agisse cependant de maladies de KAHLER authentiques (myélogramme normal à plusieurs reprises, pas d'anomalie radiologique au niveau du squelette). Pour certains de ces malades, l'évolution a pu être suivie pendant deux ans et n'a pu montrer l'apparition de

myélome, notamment dans un cas où l'étude nécropsique n'a fait que confirmer le diagnostic clinique: Athérosclérose chez un sujet de 72 ans.

Il s'agit là d'un fait que, dans l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons expliquer mais qui mériterait d'être souligné, car d'autres auteurs, dans des communications personnelles, nous ont fait part de cas semblables qui avaient attiré leur attention.

Un avenir prochain permettra peut-être d'élucider ce problème, de connaître la nature de cette protéine de « type myélomateux » et de la rattacher à un état pathologique précis.

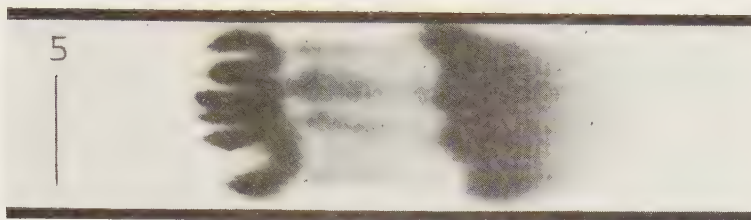


FIG. 22.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de Macroglobulinémie de WALDENSTRÖM.

La macroglobuline a un aspect festonné et arborescent. La séparation des autres protéines est mauvaise.

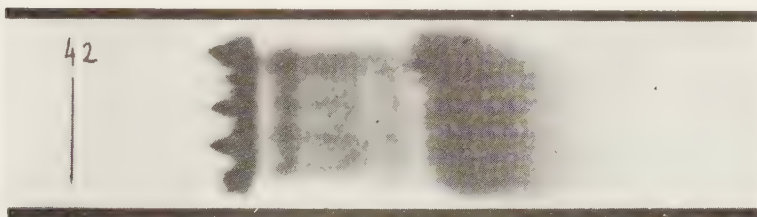


FIG. 23.

Protéinogramme sur papier Schleicher et Schüll
d'un sérum de Maladie de KAHLER.

Les constatations faites à propos de la figure 22 (Macroglobulinémie de WALDENSTRÖM) sont également valables: la globuline myélomateuse possède un aspect festonné et gêne la migration des autres protéines.

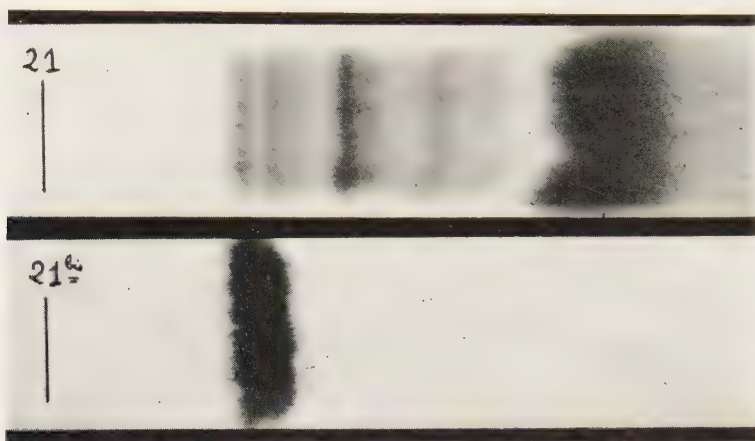


FIG. 24.

Protéinogrammes sur papier Schleicher et Schüll.

En haut: sérum de maladie de KAHLER.

En bas: urine du même malade.

La globuline myélomateuse du sérum et la protéine de BENCE-JONES sont nettement dédoublées en deux fractions distinctes.

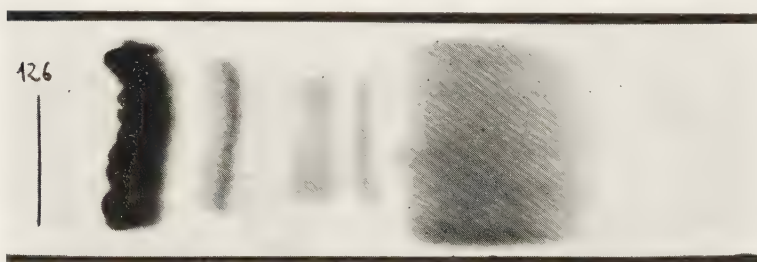


FIG. 25.

Protéinogramme sur acétate de cellulose d'un sérum de Maladie de KAHLER.

Outre la présence d'une globuline myélomateuse, l'intérêt de ce protéinogramme provient du dédoublement des α_1 globulines qui y apparaît (et n'est réalisable que sur acétate de cellulose).

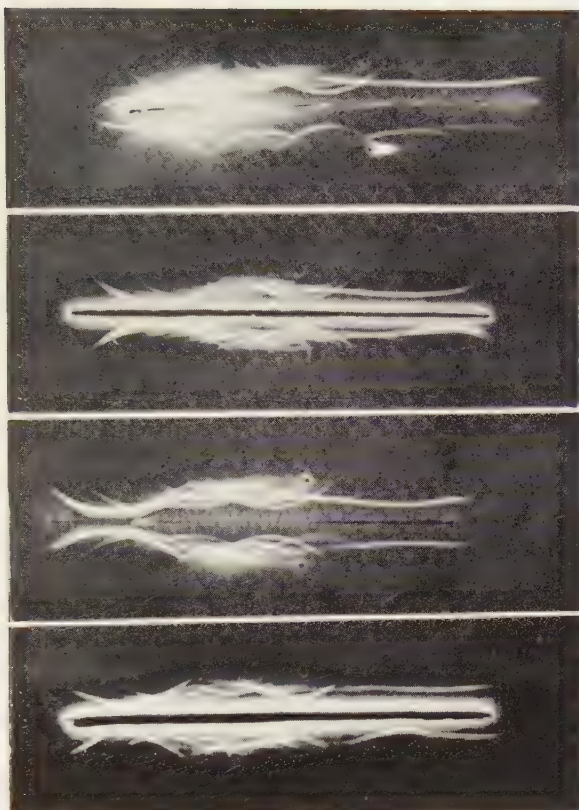


FIG. 26.

Immunoélectrophorèses de Dysglobulinémies.

(Chaque immunoélectrophorèse comporte un sérum normal à sa partie supérieure et le sérum pathologique à sa partie inférieure).

Successivement, de haut en bas :

- Macroglobulinémie de WALDENSTRÖM
(Présence d'arc de bêta, M globuline anormalement bien dessiné).
- Maladie de KAHLER
(Dédoublément de l'arc des gamma globulines dans sa portion lente).
- Maladie de KAHLER
(Arc de la bêta, A globuline anormalement bien dessiné).
- Gamma globulinémie de « type myélomateux »
(Épaississement anormal du trait de précipitation des gamma globulines à sa partie moyenne).

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous nous sommes efforcé de dégager les possibilités séparatives nouvelles qu'apporte le tampon « T.E.B. » à l'électrophorèse sur papier des sérums pathologiques.

Dès la lecture de l'article initial de ARONSSON et GRÖNWALL, nous avons été frappé par le sous-fractionnement remarquable des α_2 et des β globulines que les auteurs obtenaient sur papier et plus encore sur acétate de cellulose, et nous n'avions pas manqué d'envisager dès lors l'utilisation de ce tampon en biologie clinique pour l'étude électrophorétique des sérums présentant des perturbations au niveau de ces fractions protéiques.

Nous avons été encouragé à entreprendre cette étude par les qualités intrinsèques que présente le tampon « T.E.B. ». La préparation en est simple, les différents produits entrant dans sa composition étant solubles dans l'eau, même à froid. Sa conservation est excellente: la stabilité de cette solution électrolytique, sa non-pollution permettent de la préparer d'avance et de la stocker. Son pouvoir tampon très élevé et l'absence de dépôt aux électrodes en font un électrolyte de choix.

Toutefois, il faut avouer que nos premières tentatives ont été soumises à l'alternance de succès et d'échecs: Cette technique, pour apporter des résultats satisfaisants, constants et reproductibles, nécessite une standardisation précise et minutieuse. Aussi avons-nous décrit avec détails, dans le chapitre « Technique », les conditions expérimentales strictes qui doivent être respectées pour la réalisation des électrophorèses sur papier et sur acétate de cellulose en tampon « T.E.B. ».

Malgré ces précautions, nous nous sommes heurté à une certaine infidélité dans le sous-fractionnement des alpha et des bêta globulines qui est la qualité séparative principale de ce tampon : cette infidélité est inhérente, et nous avons eu l'occasion d'y insister précédemment à plusieurs reprises, au volume de sérum déposé sur le papier ou plus précisément à la quantité de protéines soumises au fractionnement électrophorétique. Ainsi, nous avons pu montrer que dans les cas de néphrose lipoidique, par exemple, où la teneur des α_2 globulines est particulièrement élevée, le sous-fractionnement de ces α_2 globulines n'est possible que par le dépôt d'une quantité de sérum relativement faible (de l'ordre de 5 microlitres), tandis que le dépôt habituel et normal de 15 microlitres entraînerait dans ce cas la fusion des α_2 B et 1° bêta globulines.

Un autre inconvénient du tampon « T.E.B. », et qui en limite l'emploi, est l'impossibilité d'effectuer des évaluations quantitatives par suite notamment de l'asymétrie que présente la courbe d'enregistrement photométrique de certaines fractions, et de la sérumalbumine principalement.

En conséquence, il convient de n'attribuer qu'une valeur comparative aux électrophorèses faites avec ce tampon et il est absolument nécessaire, dès lors, de mener parallèlement aux sérums pathologiques, une électrophorèse d'un sérum normal qui migrera simultanément dans la même cuve et qui servira d'élément de comparaison.

Il semble, cependant, que ces difficultés rencontrées au cours de l'application du tampon « T.E.B. » à électrophorèse sur papier ne se retrouvent pas dans l'électrophorèse pratiquée sur acétate de cellulose, support préconisé par ARONSSON et GRÖNWALL. Les résultats que nous avons obtenus sur l'acétate de cellulose sont en effet très satisfaisants et l'utilisation de ce support paraît particulièrement recommandé pour l'investigation de certaines fractions et notamment pour les glycoprotéines. Néanmoins, sa manipulation délicate et son caractère relativement onéreux en restreignent quelque peu l'emploi.

Si cette expérimentation a été poursuivie malgré ces divers inconvénients, c'est que le tampon « T.E.B. » a, à son actif, quelques avantages non négligeables et que ne présentent pas les autres techniques classiques d'électrophorèse sur papier.

Tout d'abord, et c'est son intérêt majeur, en réalisant un sous-fractionnement de certaines globulines (α_2 et β globulines), l'électrophorèse sur papier en tampon « T.E.B. » permet, dans le domaine de l'application au pathologique, de mettre en évidence des variations — augmentation, diminution ou même disparition — de certaines des sous-fractions obtenues. Ces variations pathologiques n'auraient pu apparaître avec les tampons habituels, puisque ces sous-fractions, plus ou moins perturbées par ailleurs, auraient été fusionnées au sein d'une même bande protéique.

De plus, grâce au sous-fractionnement des α_2 globulines, les α_2 glycoprotéines peuvent être estimées par la simple révélation du protéinogramme, sans avoir recours à leur coloration spécifique (acide périodique-réactif de SCHIFF). Le tampon « T.E.B. » permet donc d'aborder sous un angle nouveau le problème des α_2 glycoprotéines et apporte sa contribution à une étude qui nécessite par ailleurs, la mise en œuvre de techniques fort diverses et souvent délicates. Ces α_2 globulines présentent encore une grande complexité, mais nous pensons toutefois que l'application du tampon « T.E.B. » à certains sérums pathologiques trouve déjà une ample justification par cette seule séparation des α_2 globulines qui permet de distinguer, par une simple électrophorèse sur papier, les hyper α_2 globulinémies de type inflammatoire et les hyper α_2 globulinémies des syndromes néphrotiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-WAHAB (E.-M.) et LAURENCE (J.-W.). — Some quantitative aspects of the evaluation of plasma proteins following paper electrophoresis.
Biochem. J., 1955, **60**, 35-36. (34, 47, 49)
- ARONSSON (T.) et GRÖNWALL (A.). — Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis. A new electrophoresis buffer.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1957, **9**, 338-341. (1, 28, 37, 42, 44, 46, 52)
- ARONSSON (T.), GRÖNWALL (A.) et LAUSING (E.). — Electrophoretic protein and polysaccharide patterns in tuberculosis and amyloidosis.
Clin. chim. Acta, 1959, **4**, 124-126. (53)
- BISERTE (G.). — Dispositif d'électrophorèse sur papier.
Bioch. Bioph. Acta, 1950, **4**, 416-420. (10)
- CAMPBELL (P.-N.), KERNOT (B.-A.) et ROITT (I.-M.). — A comparison of the serum proteins of normal rats with those of rats bearing liver tumors.
Biochem. J., 1959, **71**, 155-159. (29, 36)
- CREMER (D.) et TISELIUS (A.). — Elektrophorese von Eiweiss in Filter-Papier.
Biochem. Z., 1950, **320**, 273-283. (6)
- CONDEN (R.) et POWELL (M.-N.). — The use of borate buffer in papier electrophoresis of serum.
J. Clin. Path., 1955, **8**, 150-152. (35, 48, 50)
- DURRUM (E.-L.). — A micro-electrophoretic and micro-ionophoretic technique.
J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 2943-2948. (7, 19)
- FIELD (C.-W.) et TEAGUE (O.). — On the electrical charge of the native proteins and the agglutinins.
J. exp. Med., 1907, **9**, 86, 222-225. (3)
- FORSTER (A.-B.) et STACEY (M.). — Ionophoresis of some carbohydrate derivatives.
J. appl. Chem., 1953, **3**, 19-21. (31)
- GOLDWASSER (E.) et MATHEWS (M.-B.). — The effect of borate and sulfate ions upon the electrophoretic mobility of mucoproteins.
J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 3135-3136. (33)
- GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.-A.). — Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Bioch. Bioph. Acta, 1955, **17**, 67-74. (14)
- GRASSMANN (W.) et HANNIG (K.). — Ein einfaches Verfahren zur Analyse der Serumproteine und anderer Proteingemische.
Naturwiss., 1950, **37**, 496-497. (9, 18)
- GRASSMANN (W.) et HANNIG (K.). — Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese.
Hoppe Seyler's. Z. Physiol. Chem., 1952, **290**, 1-27. (39)
- HAVEZ (R.) et BISERTE (G.). — Le tampon borate en électrophorèse de zone.
Clin. Chim. Acta, 1959, **4**, 334-339. (45)

- KOHN (J.). — A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis.
Clin. Chim. Acta, 1957, **2**, 297-303. (43)
- KOÏW (E.) et GRÖNWALL (A.). — Staining of protein bound carbohydrates after electrophoresis of serum on filter paper.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, **4**, 244-246. (11, 41)
- KÖNIG (D.). — *Actas e trab. Terc. Cong. sud-am. de Chim.*, 1937, **2**, 334. (5)
- KUNKEL (H.-G.) et SLATTER (R.-J.). — Lipoproteins patterns of serum obtained by zone electrophoresis.
J. Clin. Invest., 1952, **31**, 677-684. (13)
- MACHEBEUF (M.), REPEYROTTE (P.), DUBERT (J.-M.) et BRUNERIE (M.). — Application à l'étude de sérums pathologiques de la méthode de micro-électrophorèse sur papier.
Bull. Soc. Chim. biol., 1951, **33**, 1543-1551. (20)
- MICHAELIS (L.). —
Biochem. Z., 1909, **16**, 81. (2)
- MICHL (H.). — Paper ionophoresis at potential gradient of 50 volts/cm. Organic complexes borate.
Monatsch. Chem., 1952, **83**, 737-747. (21)
- MORETTI (J.), BOUSSIER (Geneviève), HUGON (Marie-Paule) et HARTMANN (L.). — Recherche des correspondances entre les résultats des électrophorèses sur papier, à travers un gel d'amidon et de l'immunoélectrophorèse en gélose des protéines du sérum.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, **41**, 79. (17)
- NORTHCOTE (D.-H.). — Electrophoresis of some neutral polysaccharides.
Biochem. J., 1954, **58**, 353-358. (32)
- POULIK (M.-D.). — Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers.
Nature, 1957, **180**, 1477-1479. (27)
- RAPP (R.-D.) et MEMMINGER (M.-M.). — Tris (hydroxymethyl)-aminomethane as an electrophoresis buffer.
Am. J. Clin. Path., 1959, **31**, 400-405. (22, 30)
- RICE (R.-V.), STAHPMANN (M.-A.) et ALBERTY (R.-A.). — The interaction of lysine polypeptides and bovine plasma albumine.
J. Biol. Chem., 1954, **209**, 105-115. (23)
- SARDA (L.), MARCHIS-MOUREN (G.), CONSTANTIN (M.-J.) et DESNUELLE (P.). — Sur quelques essais de purification de la lipase pancréatique.
Bioch. Bioph. Acta, 1957, **23**, 264-274. (25)
- SAVAGE (Nerina). — Preparation and properties of highly purified diaphorase.
Biochem. J., 1957, **67**, 146-155. (24)
- SCHEIDEGGER (J.-J.). — Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Internat. Arch. Allergy, 1955, **7**, 103-110. (15)
- SCHEIDEGGER (J.-J.) et MARTIN DU PAN (R.). — Etude immuno-électrophorétique des protéines sériques du nouveau-né et du nourrisson.
Et. néo-nat., 1958, **6**, 135-144. (51)
- SHAVIT (N.), WOLFE (R.-G.) et ALBERTY (R.-A.). — The electrophoresis and titration of fumarase.
J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1382-1386. (26)
- SMITHIES (O.). — Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J., 1955, **61**, 629-641. (16)
- SWAHN (B.). — A method for localisation and determination of serum lipids after electrophoretical separation on filter paper.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, **4**, 98-103. (12, 40)

- TISELIUS (A.). — Elektrophorese und Adsorptionsanalyse als Hilfsmittel zur Untersuchung hochmolekularer Stoffe und ihrer Zerfallsprodukte. Nobel Vortrag, 13 Dez. 1948. *Naturwiss.*, 1950, **37**, 25-33 (4)
- TURBA (F.) et ENENKEL (H.-J.). — Elektrophorese von Proteine in Filter-Papier. *Naturwiss.*, 1950, **37**, 93. (8)
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	3
PRINCIPE DE L'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER EN TAMPON « T.E.B. »	6
<i>Principe de l'électrophorèse différentielle</i>	6
<i>Facteurs influençant la mobilité d'une protéine</i> (support, dispositif, tampon)	7
Rôle joué par le « Tris »	10
Rôle joué par les ions borates	12
Rôle joué par l'« E.D.T.A. »	13
<i>Le tampon « T.E.B. »</i>	13
TECHNIQUE DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN TAMPON « T.E.B. »	16
<i>Technique personnelle</i>	16
<i>Discussion de la méthode</i>	21
L'ÉLECTROPHORÈSE DU SÉRUM NORMAL EN TAMPON « T.E.B. »	25
<i>Le Protéinogramme du sérum normal</i>	25
<i>Le Lipoprotéinogramme du sérum normal</i>	33
<i>Le Glycoprotéinogramme du sérum normal</i>	35
<i>Variations du protéinogramme en fonction de l'âge</i>	36
POSSIBILITÉS DU TAMPON « T.E.B. » EN PATHOLOGIE	38
1) <i>Etude analytique</i>	39
Variations de la sérumalbumine	39
Variations des gamma-globulines	40
Variations des bêta-globulines	43
Variations des alpha-globulines	47
2) <i>Etude synthétique</i>	52
La Néphrose lipoidique pure	52
La Cirrhose éthylique ascitique	55
Le Rhumatisme articulaire aigu	58
DYSGLOBULINÉMIES ET ÉLECTROPHORÈSE EN TAMPON « T.E.B. »	60
CONCLUSIONS	68
BIBLIOGRAPHIE	71

(Travail effectué au Laboratoire Central des Cliniques de Nancy,
Professeur E. de LAVERGNE.)

VU:
Nancy, le 14 octobre 1959.

Le Président de Thèse:
P. MICHON.

VU ET APPROUVÉ:
Nancy, le 15 octobre 1959.

Le Doyen:
P. SIMONIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:
Nancy, le 16 octobre 1959.

*Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,*
G. MAYER.

Imprimerie Georges Thomas-Nancy.

Dépôt légal III-1960 - N° 536

